Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik
Abteilung für Innere Medizin mit
Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. H. Rühl

INTERAKTION ZWISCHEN DEM H_2-REZEPTOR-ANTAGONISTEN CIMETIDIN UND DEM IMMUNSYSTEM: EVIDENZ FÜR DIE IN-VIVO UND DIE IN-VITRO-MODULATION DES T- UND NK-ZELLSYSTEMS DURCH CIMETIDIN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Arnd Schreckenberg
aus Nordenham

1985

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik
Abteilung für Innere Medizin mit
Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. H. Rühl

INTERAKTION ZWISCHEN DEM H_2-REZEPTOR-ANTAGONISTEN CIMETIDIN UND DEM IMMUNSYSTEM: EVIDENZ FÜR DIE IN-VIVO UND DIE IN-VITRO-MODULATION DES T- UND NK-ZELLSYSTEMS DURCH CIMETIDIN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Arnd Schreckenberg
aus Nordenham

Referent: Prof. Dr. H. Rühl

Korreferent: Prof. Dr. U. Hopf

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12. 12. 1985

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	6
	A. Histamin und Antihistaminika	6
	B. H_2-Rezeptoren an Lymphozyten	7
	C. Cimetidin und die Immunantwort	8
	D. Ziel der Untersuchung	11
II.	Material und Methoden	12
	A. Patienten und Probanden	12
	B. Präparation der Lymphozytensuspension	12
	C. Leukozytenzahl und Differentialblutbild	13
	D. Rosettentest	13
	E. Untersuchung der Oberflächenantigene mit Antikörpern	14
	F. $Chrom^{51}$-Release-Assay	17
	G. Reverser hämolytischer Plaque-Assay	18
	H. Stimulation mit Phythämagglutinin	20
	I. In-vitro Untersuchungen	21
	1. Cimetidin-Stammlösung	21
	2. $Chrom^{51}$-Release-Assay	21
	3. Reverser hämolytischer Plaque-Assay	22
	J. Statistische Methoden	23
III.	Ergebnisse	24
	A. Cimetidin, Leukozytenzahl und Differentialblutbild	24
	B. Cimetidin und Subpopulationsverteilungen mononukleärer Zellen	26
	C. Cimetidin und die NK-Funktion in vivo	35
	D. Cimetidin und die Bildung Immunglobulin sezernierender Zellen unter Pokeweed-Stimulation	39
	E. Cimetidin und die Phythämagglutinin-Stimulation	43

Seite

F. Cimetidin und die NK-Funktion in vitro 46
1. Ansatz nach 5 Stunden Vorinkubation der Effektorzellen mit Cimetidin 46
2. Cimetidin direkt im Ansatz 49
3. Cimetidin 4 Stunden vor Testende im Ansatz 52
4. Ansatz nach 5 Stunden Vorinkubation der Targetzellen mit Cimetidin 52

G. Einfluß von Cimetidin auf den reversen hämolytischen Plaque-Assay in vitro 55
1. Vorinkubation mit Cimetidin für 24 Stunden 55
2. Cimetidin direkt im Kulturansatz 57

IV. Diskussion 59

V. Zusammenfassung 66

VI. Quellenverzeichnis 68

Danksagung

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

I.A. HISTAMIN UND ANTIHISTAMINIKA

Die Wirkung des Gewebshormons Histamin und - hiermit untrennbar verbunden - die der Antihistaminika, ist seit vielen Jahren ein zunehmend wichtiges Thema der immunologischen Forschung.

Am Anfang einer ganzen Entwicklung, die letztendlich zu einem eigenständigen Forschungszweig führte, steht die Identifikation des Histamin als physiologisch aktive Substanz durch Barger und Dale im Jahre 1910 (1).

Die Erstbeschreibung eines Antihistaminikums, das in der Lage war, Histaminwirkung selektiv zu blockieren, erfolgte durch Bovet und Staub im Jahre 1937 (2). Dies leitete die Entwicklung und Beschreibung einer kaum überschaubaren Zahl von Substanzen ein, denen eine antihistaminische Wirkung zugeschrieben wurde. Nur wenige davon haben bis heute ihre Bedeutung behalten.

Ash und Schild (3) schlossen aus ihren und den Beobachtungen anderer, daß die physiologischen Aktivitäten des Histamin über zwei unterschiedliche Rezeptoren vermittelt werden. Sie bezeichneten reaktive Bezirke an der Zellmembran, über die durch Mepyramin und weitere Antihistaminika eine Blockierung stattfindet, als H_1-Rezeptoren und Histaminwirkorte, an denen Mepyramin ohne Effekt bleibt, non H_1-Rezeptoren, die heute H_2-Rezeptoren genannt werden.

Die jahrelange, intensive Suche nach H_2-Rezeptor blockierenden Substanzen führte 1972 schließlich zur Entwicklung des Burimamids, des ersten Wirkstoffs mit selektiv H_2-Rezeptor blockierender Wirkung, durch Black und Mitarbeiter (4).

Mit Metiamid, einer Weiterentwicklung des Burimamids ebenfalls durch Black et al. (5), stand der erste H_2-Rezeptorenblocker mit ausreichend therapeutischer Wirksamkeit zur Verfügung. Aber erst das von Brimblecombe et al. 1975 (6) der Öffentlichkeit vorgestellte Cimetidin erfüllte die Forderung nach therapeutischer Wirksamkeit und Nichttoxizität.

Der Wirkstoff Cimetidin ist inzwischen für den Arzneimittelmarkt zugelassen, zuerst 1976 in Großbritannien. Allgemein anerkannte Indikation von Cimetidin und der neueren Substanz Ranitidin ist das hyperacide Ulcus ventriculi und das Ulcus duodeni.

I.B. H_2-REZEPTOREN AN LYMPHOZYTEN

Erst mit den H_2-Rezeptorenblockern Burimamid, Metiamid, Cimetidin und jetzt auch Ranitidin besteht die Möglichkeit, den H_2-Rezeptorenbesatz unterschiedlicher Gewebe und Zellspezies, so auch den von Lymphozyten zu untersuchen. Seit mit Burimamid der erste H_2-Rezeptorenblocker zur Verfügung steht, erschienen Veröffentlichungen über Histaminrezeptoren an Lymphozyten und deren funktionelle Bedeutung.

Ein großer Teil der Untersuchungen, ob, und welche Lymphozytensubpopulationen Histaminrezeptoren besitzen, basieren auf Studien von Melmon et al. (7) im Mäusesystem. Dabei wurden Sepharose-Beads benutzt, an deren Oberfläche Histamin gekoppelt war. Nur ein bestimmter Teil menschlicher Lymphozyten blieb an diesen Histamin-Sepharose-Beads gebunden. Diese Bindung wurde Histaminrezeptoren zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß bei einer solcherart fraktionierten Lymphozytensuspension die nicht adsorbierten Lymphozyten eine stärkere Antikörperproduktion aufwiesen, als unfraktionierte Proben (8). Dies ließ die Autorengruppe vermuten, daß es sich bei den Lymphozyten, die die Histaminrezeptoren besitzen, um T-Lymphozyten handelt. Wenn auch Zweifel an der Bindungsspezifität der Lymphozyten an die Histamin-Sepharose-Beads berechtigt sind (9), so überwiegt doch - untermauert auch durch andere Studien (10, 11, 12, 13, 14, 15) - die Ansicht, daß es tatsächlich T-Lymphozyten sind, die Histaminrezeptoren besitzen.

Eine Reihe von in-vivo- und in-vitro-Befunden sprechen für diese Ansicht und auch dafür, daß es sich dabei um H_2-Rezeptoren handelt:

—— Meerschweinchenlymphozyten, die mit Histamin behandelt wurden, produzierten einen löslichen Faktor, der Antigenreaktivität und Sekretion von Makrophagen-inhibitorischem-Faktor (MIF) einer Lymphozytensubpopulation inhibierte. H_2-Rezeptorenblocker, aber nicht H_1-Rezeptorenblocker, konnten diese Histaminwirkung verhindern (16, 17).

—— Der hemmende Effekt von Histamin auf die entzündliche Hautreaktion vom Spättyp wurde von H_1-Antagonisten nur wenig, und vom H_2-Antagonisten Burimamid vollständig wieder aufgehoben. Dabei wurden sowohl das Histamin als auch das Burimamid lokal appliziert (18).

—— Die Lymphozytenproliferation in Anwesenheit von Mitogenen wie Phytaemagglutinin, Concanavalin-A und Pokeweed-Mitogen ist durch Histamin supprimierbar. Dies ist durch H_2-Antagonisten wie Metiamid und Cimetidin vollständig reversibel (19, 20, 21).

Untersuchungen von Plaut et al. zeigten, daß cytotoxische Effektorzellen durch Histamin in ihrer Funktion gehemmt werden und daß diese Wirkung nur durch H_2-Rezeptoren vermittelt wird. Beweisend war dabei die fehlende Hemmung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Burimamid (22) und Burimamid, Metiamid oder Cimetidin (9, 23).

I.C. CIMETIDIN UND DIE IMMUNANTWORT

Der Nachweis von H_2-Rezeptoren auf Lymphozyten mit regulatorischer Funktion, vermutlich Suppressor-T-Lymphozyten, und auf Effektorzellen vom cytotoxischen Typ macht den H_2-Rezeptorenblocker Cimetidin für die Immunologie zu einer interessanten Substanz. Mehrere Arbeitsgruppen haben sich mit den Wirkungen des Cimetidin im Bereich der Immunologie beschäftigt. Bis dato sind folgende immunomodulatorische Befunde bezüglich des Cimetidin gesichert:

— in vier Studien wird übereinstimmend eine signifikante Veränderung der Lymphozytenzahl unter Cimetidintherapie verneint (24, 25, 26, 27).

— Eine signifikante Änderung der relativen und absoluten Zahl der T-Lymphozyten konnte basierend auf Untersuchungen mit Schaferythrozytenrosetten ebenfalls nicht nachgewiesen werden (26).

— Nicht ganz einheitlich wird der Einfluß des Cimetidin auf die Antikörperproduktion beurteilt: Während Andre et al. (28) bei neun von zehn mit Cimetidin behandelten Patienten ein Absinken des IgA-Serumspiegels beobachteten, fanden McGregor et al. (29) nur bei zwei von zwölf Patienten einen verminderten IgA- und verminderten IgM-Spiegel. Auf Antigenkontakt kam es bei mit Cimetidin behandelten Mäusen zu einer vermehrten Bildung von Immunglobulin sezernierenden Zellen (30) assoziiert mit einer Verdopplung des Antikörperspiegels im Serum (31).

— Der in-vitro-Effekt von Cimetidin auf menschliche Lymphozyten bei Mitogenstimulation wird auf Grund mehrerer Untersuchungen kontrovers beurteilt.
Einerseits:
Histamin hemmte den proliferativen Effekt von Concanavalin-A (32). Histamin hemmte die Steigerung der IgG-Produktion durch Pokeweed-Mitogen. In diesen Experimenten war die Histaminwirkung sowohl im Concanavalin-A wie im Pokeweed-Mitogen-System durch Cimetidin nicht abrogierbar.
Bei einer mit Phythaemagglutinin-A stimulierten Lymphozytenkultur hatte Cimetidin keine proliferationsverstärkende Wirkung (33).
Andererseits:
Die durch Histamin bewirkte Hemmung der Concanavalin-A-Stimulation war bei Ogden et al. (21) durch Cimetidin vollständig reversibel.
Bei entsprechenden in-vivo-Untersuchungen, bei denen die Lymphozyten von mit Cimetidin behandelten Patienten vor

und während der Therapie stammen, hatte Cimetidin sowohl mit Phythaemagglutinin (24, 27, 34), als auch mit Pokeweed-Mitogen und Concanavalin-A (27) einen additiv proliferativen Effekt. Allein das Serum von Patienten, die mit Cimetidin behandelt wurden, bewirkte bei mit Phythaemagglutinin stimulierten Lymphozyten eine additive Proliferationssteigerung (35).

— Die entzündliche Hautreaktion vom Spättyp auf Recall-Antigene (Streptokinase, Streptodornase, Candida Albicans, Trichophyton und Mumps-Antigen) war bei mit Cimetidin behandelten Patienten identisch mit der von unbehandelten Kontrollpersonen (25, 36, 37). Dagegen antagonisierte Cimetidin - lokal appliziert - die Hemmung der Hautreaktion vom Spättyp durch Histamin (18).

— Die natürliche Killerfunktion (NK-Funktion) ist offenbar im Mäusesystem durch Histamin inhibierbar (38). Im Gegensatz hierzu konnte im menschlichen System eine durch Histamin antagonisierte Inhibition der NK-Funktion unter Cimetidin gezeigt werden (39, 40).

— Eine gesteigerte Alloreaktivität, wie sie sich aus der dargestellten Cimetidinwirkung ableiten läßt, stellt sicher theoretisch eine mögliche Gefahr dar, wenn H_2-Antagonisten zur Streßulkusprophylaxe z.B. nach Nierentransplantation verabfolgt werden.
H_2-Rezeptorantagonisierung scheint jedoch im Tiertransplantationsmodell, wie auch ableitbar aus klinischer Beobachtung bei transplantierten Patienten unter gleichzeitiger H_2-Rezeptorantagonistentherapie in seiner transplantatrejektiven Wirkung noch nicht endgültig beurteilbar. Kontroverse Daten sind berichtet (41, 42, 43, 44, 45).

— Eine NK-modulierende Cimetidinwirkung läßt schließlich Effekte einer solchen Therapie auf Tumorwachstum erwarten. In diesem Sinne berichten zwei Studien, in denen das Tumorwachstum bei experimentell mit Tumorzellen inokulierten Mäusen unter Cimetidin verlangsamt, und die Überlebenszeit verlängert war (46, 47). Von der Rückbildung

carcinomatöser Lungenmetastasen bei zwei Patienten berichtet eine weitere Veröffentlichung (48).

I.D. ZIEL DIESER UNTERSUCHUNG

Periphere Blutbildveränderungen und die quantitative Zusammensetzung peripherer Lymphozytensubpopulationen mit Cimetidin behandelter Patienten werden untersucht. Ergänzend werden auch funktionelle Untersuchungen im Hinblick auf immunomodulatorische Effekte von Cimetidin in-vitro und in-vivo durchgeführt. Dabei wird die Lymphozyten-Proliferation unter Phythaemagglutinin, die Induktion Immunglobulin bildender Zellen mit Pokeweed-Mitogen und die Funktion natürlicher Killerzellen untersucht. Unter Anwendung der beiden letztgenannten Funktionsteste wird die Wirkung von Cimetidin auf Lymphozyten unbehandelter Blutspender in-vitro untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen, ergänzend zu den bisherigen Studien, das Wissen um die Rolle des Cimetidin und indirekt der H_2-Rezeptoren im Immunsystem erweitern und mögliche Implikationen für die Cimetidintherapie aufzeigen.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.A. PATIENTEN UND PROBANDEN

Das untersuchte Blut stammte von dreizehn Patienten, acht Männern und fünf Frauen, im Alter zwischen neunundzwanzig und siebzig Jahren. Bei allen war ein Ulcus duodeni endoskopisch diagnostiziert worden. Es bestand kein Anhalt für weitere Erkrankungen. Es wurde eine Monotherapie mit 1000 mg Cimetidin (Tagamet^{R}) in vier Einzeldosen täglich durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte vor der ersten Einnahme des Medikaments und am achtundzwanzigsten Tag kontinuierlicher Therapie.

Für die in-vitro-Untersuchungen stammte das Blut von elf gesunden Blutspendern beiden Geschlechts, im Alter zwischen dreiundzwanzig und zweiundvierzig Jahren.

II.B. PRÄPARATION DER LYMPHOZYTENSUSPENSION

Eine Suspension mononukleärer Zellen wurde nach der Methode von Böyum (49) hergestellt. Das heparinisierte Blut wurde zuerst im Verhältnis 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Anschließend wurden vorsichtig je 35 ml der Verdünnung in einem 50 ml-Plastikröhrchen (Falcon, Frankreich) über 15 ml Ficoll-Paque der Dichte 1.077 g/ml (Pharmacia, Schweden) geschichtet. Danach folgte Zentrifugation bei 2000 U/min für 40 Minuten bei Zimmertemperatur mit der Zentrifuge Varifuge ST der Firma Haereus. In der Interphase zwischen dem verdünnten Serum und dem Ficoll-Paque mit dem Erythrozyten- und Granulozytenpellet befindet sich dann ein Ring mononukleärer Zellen. Diese wurden mit einer Pasteurpipette abgehebert und zuerst in einem 50 ml-Röhrchen, dann zweimal in einem 10 ml-Röhrchen (Greiner, BRD) mit RPMI 1640-Medium (ohne Glutamin, mit Bicarbonat; Seromed, BRD) gewaschen (1700 U/min, 10 min). Wenn nach dem ersten Waschgang eine Kontamination des Pellet mit Erythrozyten sichtbar war, wurde mit einem Erythrozyten lysierenden Puffer (NH_4Cl 8.29 g, $KHCO_3$ 1.0 g, ÄDTA 0.372 g ad 1 l aqua destillata) 10 Minuten

im Kühlschrank behandelt, und danach - wie vorher beschrieben - zweimal gewaschen. NH_4Cl-Behandlung hatte in Pilotexperimenten keinen Eigeneffekt auf Verteilung der Lymphozytensubpopulationen und Lymphozytenfunktionen. Die Zellzahl wurde mit einem Zellzählgerät (Coulter Counter, Modell ZF, Großbritannien) bestimmt und für die jeweiligen Untersuchungen auf die entsprechenden Konzentrationen mit RPMI-Medium eingestellt.

Die gesamte bis hier beschriebene Zellisolation fand an einem Gerät zum sterilen Arbeiten (Laflow, D. Bosch, BRD) unter sterilen Bedingungen statt. Nach der Zellisolation waren mehr als 95 % der mononukleären Zellen viabel. Dies wurde geprüft mit einer Trypanblaufärbung (Behring, BRD). Nach 10 Minuten Kontakt mit dem Farbstoff haben sich, im Mikroskop sichtbar, die nicht lebenden Zellen blau angefärbt.

II.C. LEUKOZYTENZAHL UND DIFFERENTIALBLUTBILD

Die Leukozytenzahlen wurden im Zählautomaten S-Plus (Coulter Counter, Großbritannien) bestimmt und ein Differentialblutbild an Hand von nach Pappenheim gefärbten Ausstrichen angefertigt.

II.D. E-ROSETTENTEST

Der Anteil der T-Lymphozyten an den isolierten mononukleären Zellen wurde mit Hilfe eines Rosettentests bestimmt (50, 51). Hierzu dienten mit Neuraminidase (aus Vibrio Cholerae, Behring, BRD) vorbehandelte Schafserythrozyten (Tierklinik der Freien Universität Berlin) als Reagenz. Zur Herstellung der Neuraminidase-Schafserythrozyten wurden 3 ml Schafserythrozyten, die vorher dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen waren, auf eine 5-prozentige Suspension im RPMI-Medium eingestellt. Hinzugefügt wurden 0.4 ml Neuraminidase und anschließend wurde 45 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal im RPMI-Medium gewaschen und erneut eine 5-prozentige Schafserythrozyten-Suspension

eingestellt. Hiervon wurden 100 µl mit 100 µl der auf $2.5x10^6$ Zellen eingestellten Zellsuspension mononukleärer Zellen und 50 µl fetales Kälberserum (Seromed-Biochrome, BRD) - zuvor mit Schafserythrozyten absorbiert und bei 56°C 30 Minuten hitzeinaktiviert, zusammenpipettiert, gemischt und 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für 5 Minuten wurde bei 700 U/min zentifugiert und weiterhin eine Stunde bei +4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach vorsichtigem Resuspendieren des Pellet und Zugabe von 50 µl Löffler's Methylenblau (Merck, BRD), zur Kontrastierung der Lymphozyten, wurde in einem Tropfen der Suspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung die Zahl der rosettenbildenden Lymphozyten pro 100 Lymphozyten bestimmt. Mindestens 200 Zellen wurden ausgezählt. Dabei zählte als Rosette jeder Lymphozyt mit wenigstens drei fest gebundenen Schafserythrozyten.

II.E. UNTERSUCHUNG DER OBERFLÄCHENANTIGENE MIT ANTIKÖRPERN

Die Differenzierung der Lymphozytensubpopulationsverteilungen basiert auf Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern im indirekten Immunfluoreszenz-Assay. Es wurden sechs verschiedene monoklonale Antikörper verwandt. Ihre Spezifität, Bezugsquelle und entsprechende Literaturverweise sind in Tabelle 1 angegeben:

Typ	Spezifität/Reaktivität	Bezugsquelle	Literatur
OKT 4	T-Helfer/Inducer-Zellen	Ortho-Laboratories USA/BRD	52
OKT 8	T-Suppressor-Zellen, cytotoxische T-Lymphozyten	Ortho-Laboratories USA/BRD	52
OKM 1	Monozyten, reife granulozytäre Zellen Subpopulationen von NK- und K-Zellen	Ortho-Laboratories USA/BRD	53,54,55 56,57
L 243 HLA-DR(Ia)	B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Becton/Dickinson USA	58
BA 1	alle B-Zellen, Granulozyten	Hybritech	59
Leu 7 (=HNK 1)	Zellen mit Killer- und Natürlicher Killer-Funktion	Becton/Dickinson USA	54,55,56 60,61

Tabelle 1: Ausgewählte monoklonale Antikörper zur Erfassung von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut.

800 µl einer mit RPMI 1640-Medium auf $2.5x10^6$ Zellen/ml eingestellten Suspension mononukleärer Zellen wurden in Plastikhütchen (Eppendorf, BRD) zentrifugiert (Hettich, Mikroliterzentrifuge bei 650 g, 2 min). Nach Dekantieren des Überstandes wurden 25 µl des monoklonalen Antikörpers unter Aufwirbeln des Pellets hinzugefügt und 30 Minuten im Eiswasserbad inkubiert. In dieser Zeit binden die Antikörper an den antigenen Bereichen der Zelloberfläche. Danach wurde zweimal in phosphatgepufferter Saline (PBS ohne Ca und Mg, Seromed, BRD) mit 2 % fetalem Kälberserumanteil (Bovines Serumalbumin, Behring, BRD) und 2 g/l Natriumacid (Merck, BRD) gewaschen. Dabei wird nicht gebundener Antikörper entfernt. Das Natriumacid verhindert den Vorgang des Capping, das heißt die Eigenart der Lymphozyten, den gebundenen Antikörper an einer Stelle seiner Oberfläche zu sammeln und schließlich in sein Zellinneres zu befördern. Nach Dekantieren des Überstandes wurde mit 25 µl fluoreszeinmarkiertem IgM+IgG-Ziegenantiserum, das gegen Mausantikörper gerichtet ist (zur Verfügung gestellt von Prof. W. Knapp, Institut für Immunologie, Wien), aufgewirbelt und 30 Minuten unter dreimaligem Schütteln im Eiswasserbad inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen wiederum in phosphatgepufferter Saline mit fetalem Kälberserum und Natriumacid, und im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, mit UV-Zusatz, Quecksilber-Höchstdrucklampe 50 W, BRD) wurde ausgewertet (Vergrößerung 10x100). Als Ergebnis werden angegeben die Anzahl der fluoreszierenden Zellen pro 100 Zellen in Prozent, wobei mindestens 200 Zellen ausgezählt wurden.

II.F. CHROM^{51}-RELEASE ASSAY

Zur Beurteilung der natürlichen Killerfunktion (NK-Funktion) wurde ein Chrom^{51}-Release Assay durchgeführt (62, 63, 64). K-562-Zellen, eine Zellinie von Erythroiden Blastenzellen einer chronisch myeloischen Leukämie (zur Verfügung gestellt von Dr. Rodt, GSF, München), dienten als Zielzellen. Die Zellen befanden sich in Dauerkultur im Brutschrank bei 37°C und in fünfprozentiger CO_2-Raumluftatmosphäre in RPMI-Medium 1640 mit 10 % Anteil fetalen Kälberserums, 1 % Penicillin/Streptomycin (Seromed, BRD) und 2 % L-Glutamin (Seromed, BRD). Sie wurden dreimal in der Woche in frisches Medium in neue Kulturflaschen (25 cm², Falcon, USA) umgesetzt.

Nach zweimaligem Waschen in RPMI 1640 (200 g, 5 min) wurden $0.5x10^6$ oder $1x10^6$ lebende K-562-Zellen, je nach Versuchsumfang, mit Natrium (Cr^{51})-Chromat (Behring, BRD) mit der Aktivität 19 MBq für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dabei dringt Chrom^{51} in die Zellen ein und bindet kovalent an intrazelluläre Plasmaproteine. Anschließend wurde dreimal in RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum gewaschen (Zentrifuge von Ecco, bei 200 g, 5 min).

100 µl mit $5x10^3$ der markierten Targetzellen wurden mit 100 µl Zellsuspension, die $10x10^4$, $5x10^4$, $2.5x10^4$ und $1.25x10^4$ mononukleäre Zellen enthielten, in Mikrotiterplatten mit V-Boden (Greiner, BRD) zusammenpipettiert. Das ergibt ein Effektor-Targetzellverhältnis von 20:1 bis 2.5:1. Es wurde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2-Atmosphäre 4-24 Stunden inkubiert. In dieser Zeit nehmen die NK-Zellen mit den Targetzellen Kontakt auf und zerstören sie. Dabei wird das intrazellulär gebundene Chrom^{51} frei.

Danach wurde bei 200 g 5 Minuten zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in Plastikröhrchen (10.5x40 mm, Greiner, BRD) abpipettiert. Die Röhrchen wurden mit Lamellenstopfen verschlossen, und die beinhaltete Aktivität im Gamma-Zählgerät der Firme Berthold gemessen. Die Ergebnisse werden angegeben als Chromrelease in Prozent, ermittelt nach der Formel:

$$\text{Chromrelease (\%)} = \frac{\text{Aktivität d.Probe - Spontanrelease}}{\text{Aktivität maximal - Spontanrelease}} \times 100$$

Bei den Proben für Maximalaktivität und Spontanrelease wurde statt mononukleären Zellen komplettes Kulturmedium einpipettiert. Spontanrelease ist dann 100 µl des Überstandes nach Zentrifugation, und Maximalaktivität sind 100 µl der gründlich aufgewirbelten Zellsuspension. Alle Ansätze erfolgten in Tripletts, deren Aktivitäten gemittelt wurden. Für die Auswertung im Ergebnisteil wurden das Effektor-Target-Zellverhältnis von 10:1 und eine Inkubationsdauer von 18 Stunden verwandt, da hierbei in Vorversuchen (57) der Chromrelease optimal war.

II.G. REVERSER HÄMOLYTISCHER PLAQUE-ASSAY

Der reverse hämolytische Plaque-Assay, ausführlich beschrieben bei Sieber et al. (65), hat folgendes Prinzip: Lymphozyten werden mit Pokeweed-Mitogen, einem B-Zellen-Stimulator, in Kultur genommen. Dabei proliferieren besonders die B-Lymphozyten und reifen bei Anwesenheit von aktiven T-Helfer-Zellen zu Immunglobulin sezernierenden Zellen aus. Staphylokokkus Aureus-Protein A wird an Schafserythrozyten gekoppelt. Dieses Protein A bindet den Fc-Abschnitt der produzierten menschlichen Immunglobuline. Antihumanserum vom Kaninchen geht eine Bindung mit diesem Immunglobulin ein. Es dient als Aktivator für hinzugefügtes Meerschweinchenkomplement, das die betreffenden Erythrozyten lysiert. Da die gesamte Reaktion in einer Agarschicht stattfindet, kann man an dem Ort einer Immunglobulin sezernierenden Zelle einen Hämolysehof erkennen. Auf diese Weise läßt sich die Zahl der Immunglobulin sezernierenden Zellen numerisch auswerten.

Die mononukleären Zellen wurden mit einer Konzentration von $1x10^6$ Zellen pro Milliliter in RPMI 1640-Medium kultiviert. Diese Suspension beinhaltete zusätzlich fetales Kälberserum, bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert (Seromed, BRD), mit einer Konzentration von 10 %, 2 % L-Glutamin (Seromed, BRD), 1 % Penicillin (Seromed, BRD) und 1 % Streptomycin (Seromed,

BRD). 3 ml dieses Ansatzes wurden in Plastikkulturröhrchen (16x125, Falcon, USA) für 6 Tage bei 37°C und 5 % CO_2-Atmosphäre bebrütet. Jeder Ansatz pro Patient bestand aus drei solcher Röhrchen, zweien mit 45 µl Pokeweed-Mitogen (Gibco, USA, gelöst in 5 ml), und einem ohne zur Kontrolle der Spontanproliferation. Die Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen am Laflow-Gerät (Laflow D. Bosch, BRD) angesetzt. Am sechsten Tag wurde zuerst die Zellzahl bestimmt, und dann wurden die Zellen dreimal in Hank's Puffer (Gibco, Großbritannien) gewaschen (400 g, 10 min).

Die Schafserythrozyten wurden vorher mit Protein A (Pharmacia, Schweden) gecoated. Hierzu wurden 15 ml Schafserythrozyten in 50 ml-Plastikröhrchen (Falcon, USA) mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung dreimal gewaschen (400 g, 10 min). Mit einer Pasteurpipette wurde die Buffy-Coat abgenommen und nochmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. In einem 50 ml-Plastikröhrchen wurden 10 ml einer $CrCl_3$-Lösung (Merck, BRD) mit 66 µg/ml vorgelegt. Hier hinein wurden hintereinander 1 ml mit 5 mg Protein A und 1 ml der gewaschenen Erythrozyten pipettiert. Es folgte eine Stunde Inkubation bei 30°C im Wasserbad. Danach wurde zweimal in kalter Kochsalzlösung und einmal in Hank's Puffer (200 g, 5 min) gewaschen.

25 µl der so präparierten Schafserythrozyten wurden mit 100 µl mit $1x10^4$ Zellen aus der Kultur und mit 250 µl 0.8 prozentiger Agarose (Indubiose, L'Industrie Biologique Francaises, Frankreich) gemischt. Dabei war die Agarose bei 41°C in 10x75 mm-Glasröhrchen im Wasserbad bereitgehalten. Das Gemisch wurde sofort in vorbereitete 60x15 mm Plastikpetrischalen (Lab-Tek-Division, USA) auf 2.5 prozentige Agarose (Serva, BRD) geschichtet. Nach Erkalten wurden 2 ml 1:200 mit Isogevers - 100 mg Gelatine, 50 µl 2.0 M $MgCl_2$, 50 µl 0.3 M $CaCl_2$ mit physiologischer Kochsalzlösung auf 80 ml aufgefüllt und um 20 ml Veronal-Pufferlösung (41.5 g/l NaCl, 5.1 g/l Na-Barbital in aqua dest. mit 5 N HCl auf pH 7.5 eingestellt) ergänzt - verdünntes Anti-

humanglobulin gegen IgA, IgG und IgM vom Kaninchen addiert (DAKO-Boehringer, Ingelheim, BRD). Nach 90 Minuten im Brutschrank (37°C, 5 % CO_2) wurde 1:8 mit Isogevers verdünntes Meerschweinchenkomplement (Behring, BRD) hinzugefügt. Dieses Komplement war vorher mit gewaschenen Schafserythrozyten absorbiert worden, um unspezifische Lyse zu vermeiden. Nach weiteren 60 Minuten im Brutschrank wurden die Platten abgegossen und die entstandenen Hämolyseplaques ausgezählt. Das Ergebnis wird angegeben in Anzahl der Plaques (= Immunglobulin sezernierende Zellen ISZ) pro 10^6 ursprünglich in Kultur gegebene Zellen. Negativkontrollen ohne Zellen, ohne Komplement und ohne Antikörper wurden regelmäßig durchgeführt.

II.H. STIMULATION MIT PHYTHÄMAGGLUTININ

Stimulation von Lymphozyten mit Mitogenen und anschließende Messung der durch gesteigerte DNS-Synthese erhöhten Thymidineinbaurate mit Hilfe von mit Tritium markiertem Thymidin ist eine gebräuchliche Methode zur Messung von Proliferation. Phythämagglutinin (PHA) ist ein T-Zellen stimulierendes Mitogen (66, 67, 68).

Die peripheren mononukleären Zellen ($5x10^4$ Zellen/well in 0.2 ml RPMI 1640, 15 % fetales Kälberserum, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin) wurden in Rundbodenmikrotiterplatten (Greiner, BRD) in 5 % CO_2-Atmosphäre bei 37°C in Anwesenheit von 1 µg/ml Phythämagglutinin (Wellcome, Großbritannien) in Tripletts kultiviert. Als Kontrollen dienten gleiche Kulturansätze ohne Phythämagglutinin. Während der letzten 12 Inkubationsstunden wurden sämtliche Kulturen mit 1 µCi H^3-Thymidin (H^3-TdR, Behring, BRD), dessen spezifische Aktivität 2 Ci/mMol betrug, gepulst und nach 72 Stunden Gesamtkulturdauer schließlich mit dem Mash II-Gerät (Flow-Laboratories, USA) geerntet. Die H^3-TdR-Inkorporation wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard, USA) gemessen. Die Ergebnisse sind als Δ cpm, also der Differenz zwischen stimulierten und Kontrollkulturen, angegeben.

II.I. IN-VITRO UNTERSUCHUNGEN

II.I.1. Cimetidin-Stammlösung

Für die in-vitro Untersuchungen wurde Cimetidin als Reinsubstanz verwendet, zur Verfügung gestellt durch Smith, Kline und French, Großbritannien. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde eine Stammlösung hergestellt. 1260 mg (≙ 5 mMol) wurden in 5.5 ml 1N HCl (Titrisol, Merck, BRD) gelöst. Dann wurden 10 ml 0.1 N NaOH (Titriplex, Merck, BRD) hinzugefügt und mit Aqua bidestillata auf 100 ml aufgefüllt. Dies ergab eine Stammlösung mit $5x10^{-2}M$ Cimetidinkonzentration. Die jeweils benötigten endgültigen Konzentrationen wurden hieraus mit RPMI 1640 eingestellt. Der Serumspiegel beim Menschen bei Gabe von 1000 mg Cimetidin täglich liegt bei etwa $1x10^{-6}M$ (69). Entsprechend wurde bei den in-vitro Untersuchungen in jedem Versuchsabschnitt die Konzentration von $1x10^{-6}M$ am Ansatz beteiligt.

II.I.2. Chromrelease-Assay

Es wurden drei verschiedene Ansätze durchgefügt. Dabei war das Effektor-Targetzellverhältnis 10:1.

a) Mononukleäre Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO_2-Atmosphäre im Brutschrank mit Cimetidinkonzentrationen von $10^{-3}M$, $10^{-6}M$, $10^{-8}M$ und ohne Cimetidin fünf Stunden vorinkubiert, danach zweimal im RPMI-Medium gewaschen und in den Assay eingesetzt, wie unter II.F. beschrieben.

b) 75 µl mit $5x10^{3}$ $Chrom^{51}$-markierten K 562-Zellen wurden mit 75 µl mononukleären Zellen zusammenpipettiert. Hinzugefügt wurden zum einen 50 µl Medium, zum anderen 50 µl Cimetidin mit den Konzentrationen $4x10^{-3}M$, $4x10^{-4}M$, $4x10^{-5}M$, $4x10^{-6}M$, $4x10^{-7}M$ und $4x10^{-8}M$, so daß durch die 1:4-Verdünnung die Endkonzentrationen $10^{-3}M$ bis $10^{-8}M$ entstanden. Es wurden Spontanansätze für die jeweilige Cimetidinkonzentration mitgeführt und bei der Berechnung zugrunde gelegt.

c) Der Ansatz war hier, wie bei b), nur mit dem Unterschied, daß das Cimetidin, beziehungsweise das Medium erst 4 Stunden vor Ende der Inkubation hinzugefügt wurde.

Ausgewertet wurde bei a) bis c), wie unter II.F. beschrieben. Bei diesen Untersuchungen konnte die prozentuale Hemmung der NK-Aktivität durch Cimetidin angegeben werden. Sie wurde berechnet nach der Formel:

$$\text{Hemmung der NK-Funktion (\%)} = \left(1 - \frac{\text{\% NK mit Cimetidin}}{\text{\% NK ohne Cimetidin}}\right) \times 100$$

In a) bis c) wurden mögliche, durch Cimetidin beurteilte Vitalitätsunterschiede der Monozyten durch Trypanblaufärbung geprüft.

II.I.3. Reverser hämolytischer Plaque-Assay

Hier wurden zwei Ansätze gemacht:

a) Mononukleäre Zellen wurden mit Cimetidin in den Konzentrationen 10^{-3}M, 10^{-6}M, 10^{-8}M und ohne Cimetidin in RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2-Atmosphäre inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Danach wurde zweimal in Medium gewaschen und der Kulturansatz gemacht, wie unter II.G. beschrieben.

b) In diesem dritten Abschnitt befand sich Cimetidin in den Konzentrationen 10^{-3}M, 10^{-6}M, 10^{-8}M direkt im Ansatz für die gesamten 6 Tage der Inkubation. Die Kontrollkultur enthielt kein Cimetidin.

Der nachfolgende Plaque-Assay wurde bei a) und b) durchgeführt, wie unter II.G. beschrieben.

Mögliche Vitalitätsunterschiede in den Röhrchen mit und ohne Cimetidin wurden mit der Trypanblaufärbung geprüft.

II.J. STATISTISCHE METHODEN

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der zweiseitige Wilcoxon-Test für Paardifferenzen angewandt (70, 71).

Da die mononukleären Zellen vor und während der Therapie untersucht wurden, entstanden untereinander verbundene Wertepaare. Über die Verteilungsart der Differenzen war nichts Näheres bekannt. Der Wilcoxontest ist verteilungsunabhängig und daher geeignet.

Für die in-vitro Untersuchungen galt Ähnliches. Da die Zellen eines Spenders unter verschiedenen Bedingungen getestet wurden, entstanden auch hier verbundene Werte, die ebenso analysiert werden konnten.

Zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurden Tabellen benutzt (72). Ein Signifikanzniveau von $P \leq 0.05$ wurde als ausreichend erachtet. Oberhalb der 5 %-Grenze galt daher die Nullhypothese als nicht ausgeschlossen, das heißt, eine signifikante Änderung der Werte konnte in einem solchen Fall statistisch nicht festgestellt werden.

III. ERGEBNISSE

III.A. CIMETIDIN, LEUKOZYTENZAHL UND DIFFERENTIALBLUTBILD

Die Ergebnisse der Leukozytenzählung sowie der Differenzierung von mononukleären Zellen sind vollständig in Tabelle 2 aufgeführt.

Betrachtet man die Veränderungen der absoluten Zahl der Gesamt-Leukozyten sowie der Mononukleären, so ist keine Tendenz zu Erhöhung oder Verminderung erkennbar. Auf Grund des Wilcoxontests für Paardifferenzen läßt sich die Nullhypothese nicht ablehnen. Somit hatte Cimetidin keinen nachweisbaren Einfluß auf die Zahl der Gesamtleukozyten, Lymphozyten und Monozyten.

Patient Nr.		vor Therapie (G/l)	unter Cimetidin (G/l)
1)	Leukozyten	9,800	8,300
	Lymphozyten absolut	1,666	3,154
	Monozyten absolut	0,392	0,332
2)	Leukozyten	11,700	11,600
	Lymphozyten absolut	2,808	3,712
	Monozyten absolut	0,936	0,580
3)	Leukozyten	6,700	7,000
	Lymphozyten absolut	2,680	2,170
	Monozyten absolut	0,134	0,630
4)	Leukozyten	7,100	6,500
	Lymphozyten absolut	1,917	2,210
	Monozyten absolut	0,639	0,715
5)	Leukozyten	5,600	7,500
	Lymphozyten absolut	2,184	1,500
	Monozyten absolut	0,560	0,225
6)	Leukozyten	8,500	8,700
	Lymphozyten absolut	2,890	3,219
	Monozyten absolut	0,425	0,435
7)	Leukozyten	7,400	7,900
	Lymphozyten absolut	2,442	2,133
	Monozyten absolut	0,222	0,316
8)	Leukozyten	9,300	8,700
	Lymphozyten absolut	3,534	3,219
	Monozyten absolut	0,651	0,522
9)	Leukozyten	6,900	8,200
	Lymphozyten absolut	1,518	2,378
	Monozyten absolut	0,414	0,656
Mittelwerte:	Leukozyten	8,111	8,267
	Lymphozyten absolut	2,404	2,633
	Monozyten absolut	0,486	0,490

Tabelle 2: Ergebnisse aus Leukozytenzählung und Blutbilduntersuchung vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. (Erhaltungsdosis 1000 mg/die).

III.B. CIMETIDIN UND SUBPOPULATIONSVERTEILUNGEN MONONUKLEARER ZELLEN

Die Markeruntersuchungen mit dem E-Rosettentest und den monoklonalen Antikörpern konnten ausnahmslos bei allen dreizehn Patienten durchgeführt werden. In Tabelle 3 sind alle Ergebnisse dokumentiert. Die Graphiken von Abbildung 1 bis Abbildung 7 veranschaulichen die Veränderungen bei jedem einzelnen Patienten unter Cimetidintherapie, während Abbildung 8 die Mittelwerte mit den Standardabweichungen summarisch erfaßt.

Die statistische Analyse ergibt, daß bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bei den Untersuchungen mit den Antikörpern OKM 1 und Leu 7 die Alternativhypothese angenommen werden kann. Bei Untersuchungen mit allen anderen Antikörpern kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Demnach hat das Cimetidin eine prozentuale Abnahme der mit OKM 1- und Leu 7-positiven Zellen bewirkt, bei fehlender quantitativer Beeinflussung der übrigen Subpopulationen.

Patient Nr.	Marker-untersuchung	vor der Therapie	unter Cimetidin
1)	E_N-Rosetten	73%	80%
	OKT 4	50%	50%
	OKT 8	14%	15%
	OKM 1	11%	6%
	L 243 (Ia)	14%	15%
	BA 1	7%	8%
	Leu 7	8%	10%
2)	E_N-Rosetten	72%	76%
	OKT 4	48%	52%
	OKT 8	30%	26%
	OKM 1	10%	7%
	L 243 (Ia)	12%	9%
	BA 1	12%	3%
	Leu 7	19%	10%
3)	E_N-Rosetten	75%	68%
	OKT 4	48%	43%
	OKT 8	29%	33%
	OKM 1	9%	11%
	L 243 (Ia)	6%	18%
	BA 1	5%	9%
	Leu 7	16%	13%
4)	E_N-Rosetten	76%	75%
	OKT 4	48%	46%
	OKT 8	20%	28%
	OKM 1	18%	17%
	L 243 (Ia)	15%	15%
	BA 1	3%	8%
	Leu 7	12%	9%

Tabelle 3: Ergebnisse der Untersuchungen mit dem E_N-Rosettentest und monoklonalen Antikörpern vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. (Erhaltungsdosis 1000 mg/die; Anteil der mit dem entsprechenden Antikörper reagierenden Zellen in Prozent).

Patient Nr.	Marker-untersuchung	vor der Therapie	unter Cimetidin
5)	E_N-Rosetten	80%	84%
	OKT 4	47%	45%
	OKT 8	27%	25%
	OKM 1	18%	16%
	L 243 (Ia)	16%	12%
	BA 1	10%	9%
	Leu 7	14%	11%
6)	E_N-Rosetten	73%	72%
	OKT 4	49%	43%
	OKT 8	29%	28%
	OKM 1	20%	15%
	L 243 (Ia)	12%	11%
	BA 1	8%	8%
	Leu 7	16%	8%
7)	E_N-Rosetten	77%	80%
	OKT 4	48%	48%
	OKT 8	23%	22%
	OKM 1	8%	7%
	L 243 (Ia)	12%	4%
	BA 1	3%	5%
	Leu 7	16%	10%
8)	E_N-Rosetten	78%	80%
	OKT 4	47%	45%
	OKT 8	25%	25%
	OKM 1	14%	9%
	L 243 (Ia)	11%	8%
	BA 1	6%	4%
	Leu 7	22%	9%

Tabelle 3: Fortsetzung

Patient Nr.	Marker-untersuchung	vor der Therapie	unter Cimetidin
9)	E_N-Rosetten	67%	73%
	OKT 4	46%	48%
	OKT 8	22%	23%
	OKM 1	22%	11%
	L 243 (Ia)	19%	18%
	BA 1	6%	5%
	Leu 7	8%	15%
10)	E_N-Rosetten	74%	78%
	OKT 4	41%	47%
	OKT 8	20%	19%
	OKM 1	13%	12%
	L 243 (Ia)	11%	10%
	BA 1	4%	12%
	Leu 7	17%	15%
11)	E_N-Rosetten	74%	79%
	OKT 4	42%	39%
	OKT 8	20%	26%
	OKM 1	7%	8%
	L 243 (Ia)	9%	11%
	BA 1	6%	5%
	Leu 7	9%	8%
12)	E_N-Rosetten	71%	68%
	OKT 4	47%	42%
	OKT 8	204	23%
	OKM 1	11%	7%
	L 243 (Ia)	13%	10%
	BA 1	5%	7%
	Leu 7	12%	10%

Tabelle 3: Fortsetzung

Patient Nr.	Marker-untersuchung	vor der Therapie	unter Cimetidin
13)	E_N-Rosetten	75%	79%
	OKT 4	39%	48%
	OKT 8	23%	22%
	OKM 1	6%	5%
	L 243 (Ia)	8%	6%
	BA 1	10%	7%
	Leu 7	9%	11%
Mittelwerte ± Standard-abweichung	E_N-Rosetten	74,2 ± 3,3%	76,3 ± 4,9%
	OKT 4	46,2 ± 3,3%	45,8 ± 3,5%
	OKT 8	23,2 ± 4,6%	24,2 ± 4,5%
	OKM 1	12,8 ± 5,2%	10,1 ± 4,0%
	L 243 (Ia)	12,2 ± 3,4%	11,3 ± 4,3%
	BA 1	16,5 ± 2,8%	6,9 ± 2,5%
	Leu 7	13,7 ± 4,4%	10,7 ± 2,3%

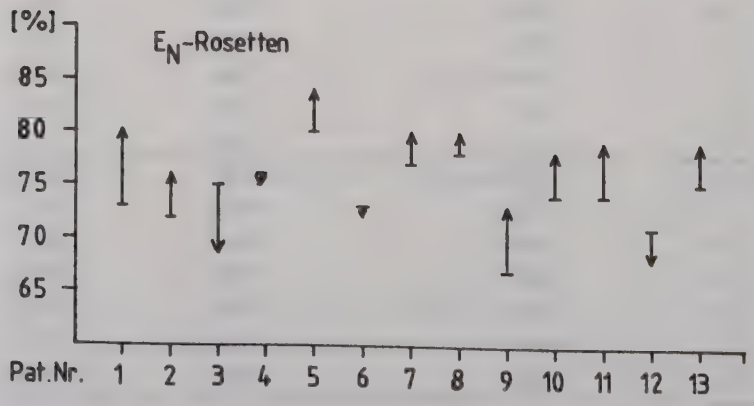
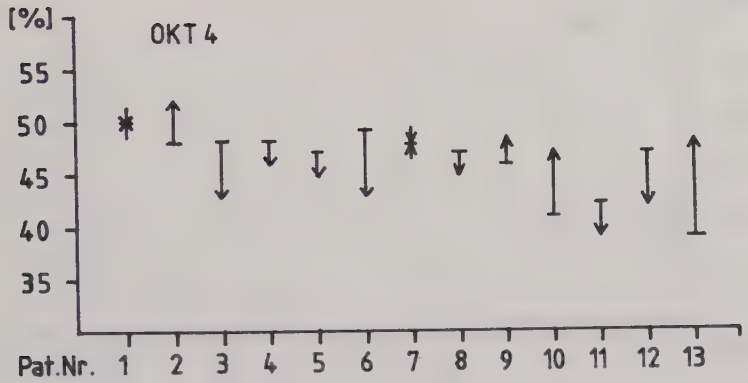


Abb. 1: Anteil der T-Zellen vor (⊢·····) und am 28. Tag der Cimetidintherapie (·····→) bei jedem Patienten, ermittelt mit dem E_N-Rosettentest.



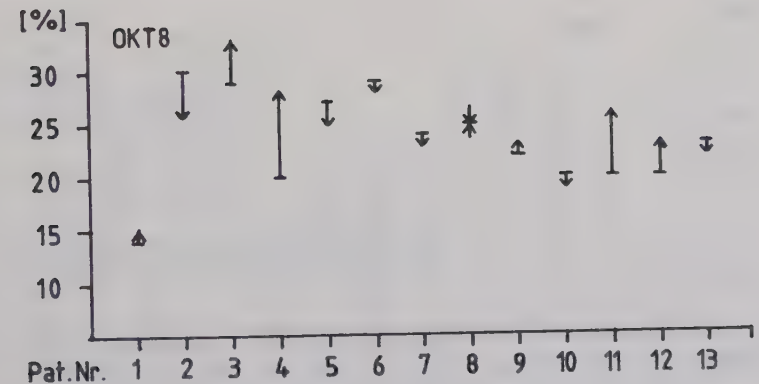
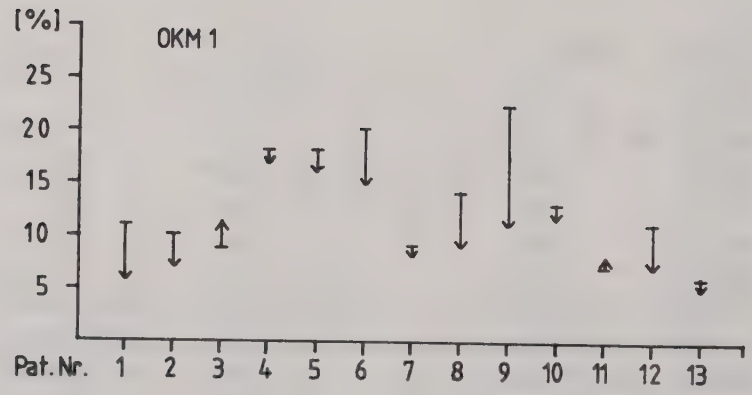


Abb. 2 und 3: Anteil der mit OKT 4 und OKT 8 reagiblen Zellen vor (⊢----) und am 28. Tag der Cimetidintherapie (----→) in Prozent.
(→← = unverändert).



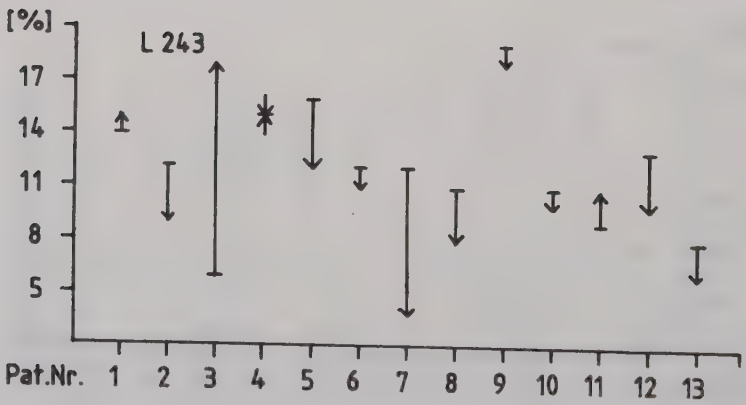
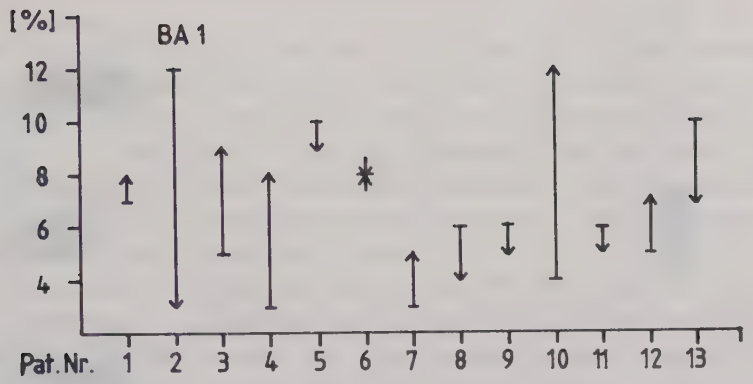


Abb. 4 und 5: Anteil der mit OKM 1 und L 243 (Ia) reagiblen Zellen vor (⊢-----) und am 28. Tag der Cimetidintherapie (-----→) in Prozent.
(→← = unverändert)



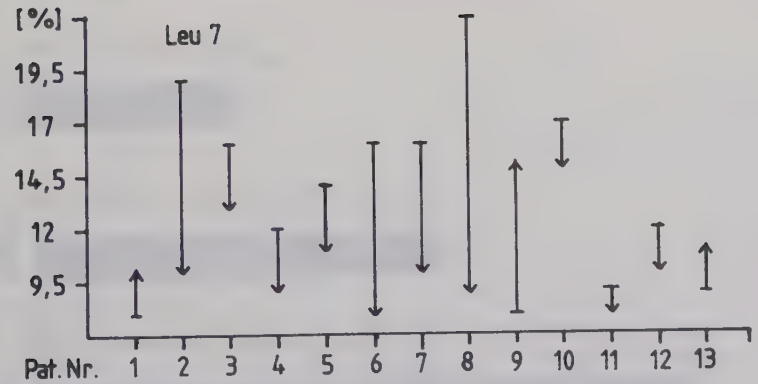


Abb. 6 und 7: Anteil der mit BA 1 und Leu 7 reagiblen Zellen vor (⊢----) und am 28. Tag der Cimetidintherapie (----→) in Prozent. (⋊ = unverändert)

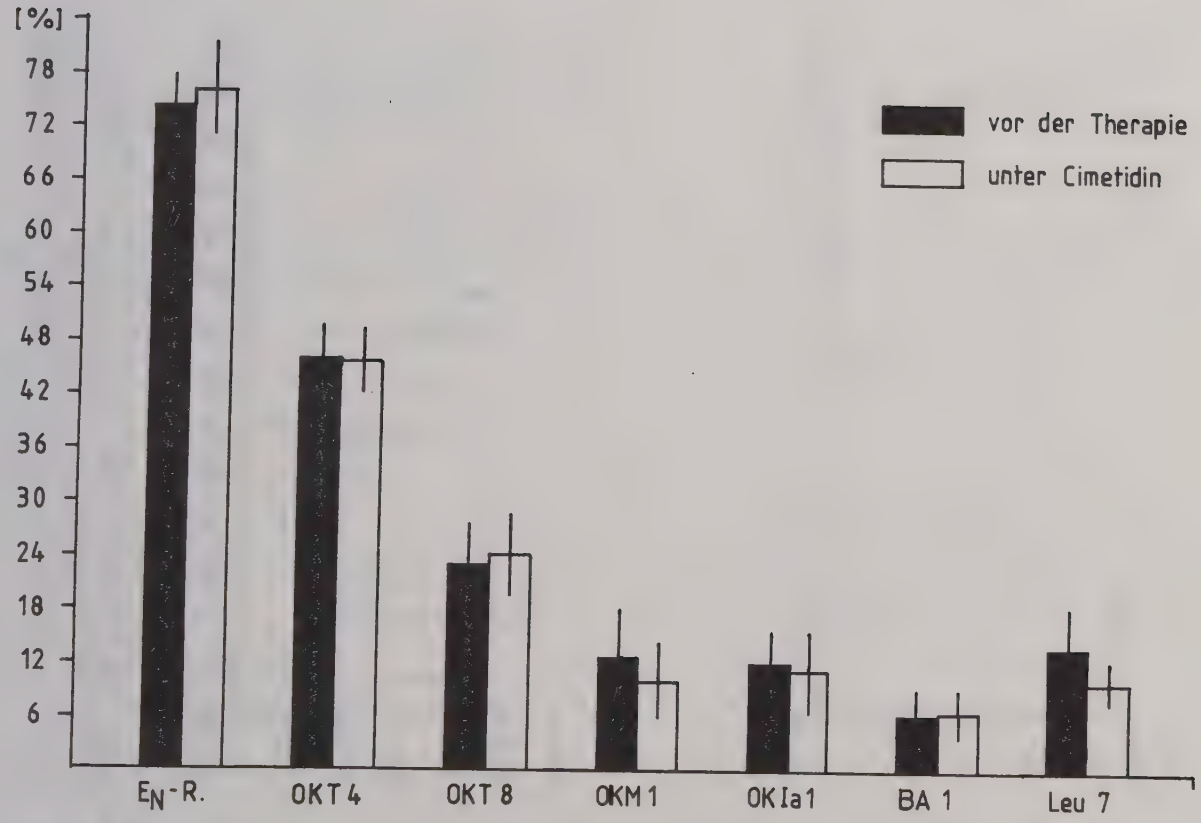


Abb. 8: Synoptische Darstellung aller Membranmarkeruntersuchungen (Mittelwerte und Standardabw.).

III.C. CIMETIDIN UND DIE NK-FUNKTION IN VIVO

Die NK-Funktion konnte mit Hilfe des Cr^{51}-Release-Assays bei elf Patienten vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie ermittelt werden. Die Tabelle 4 gibt die Meßdaten vollständig wieder. In Abbildung 9 sind die Änderungen der NK-Funktion bei jedem Patienten unter Cimetidinwirkung synoptisch dargestellt, und es wurden die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen veranschaulicht (Abbildung 10).

Einem Anstieg des Release in zwei Fällen stehen neun verminderte Werte gegenüber. Die statistische Analyse ergibt bei den vorliegenden Daten, daß Cimetidin bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % einen mindernden Effekt auf die cytotoxische NK-Funktion der Patienten hatte.

Patient Nr.	Chromrelease: vor der Therapie	unter der Therapie
1)	27%	40%
2)	22%	15%
3)	30%	26%
4)	36%	11%
5)	50%	27%
6)	36%	24%
7)	40%	28%
8)	26%	14%
9)	19%	17%
10)	20%	21%
11)	27%	14%
Mittelwert ± Standardabweichung	30,3 ± 9,4%	21,5 ± 8,5%

Tabelle 4: NK-Funktion vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie (Erhaltungsdosis 1000 mg/die). Angabe des Chromreleases in Prozent. (Inkubationsdauer 18 Stunden, Effektor-Targetzellverhältnis 1:10)

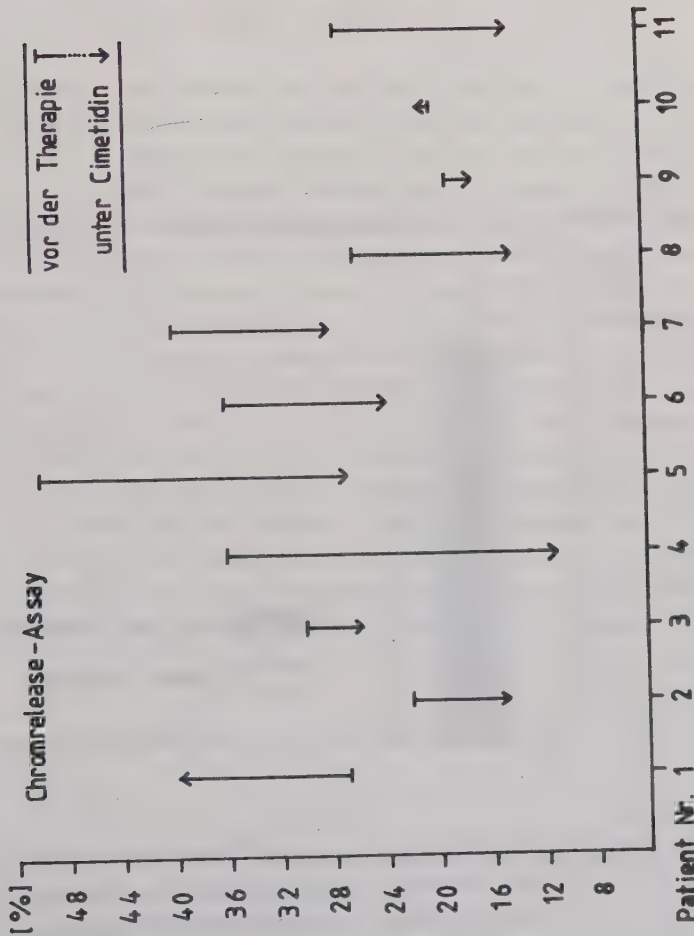


Abb. 9: Darstellung der Einzelergebnisse des Chrom^{51}-Release-Assays vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. (Inkubationsdauer 18 Stunden, Effektor-Targetzellverhältnis 1:10)

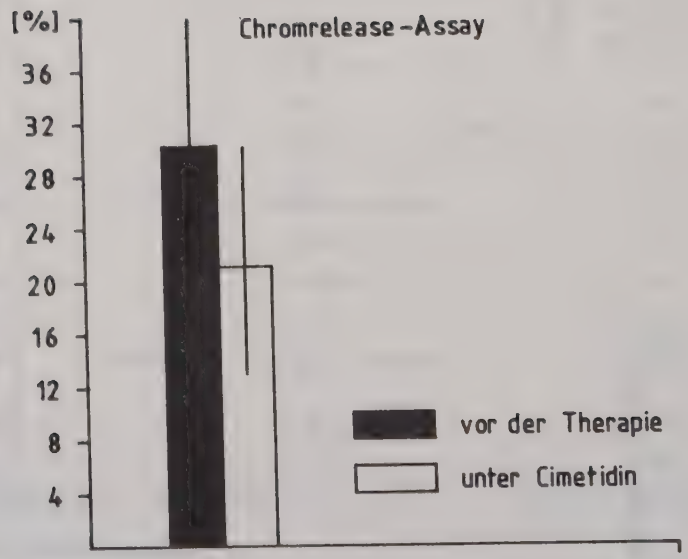


Abb. 10: Ergebnisse des Chrom^{51}-Release-Assays vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

III.D. CIMETIDIN UND DIE BILDUNG IMMUNGLOBULIN SEZERNIERENDER ZELLEN UNTER POKEWEED-STIMULATION

Die Testung der Lymphozyten auf ihre Fähigkeit, unter Pokeweed-Stimulation Immunglobulin sezernierende Zellen zu differenzieren und deren Beeinflussung durch Cimetidintherapie war ein weiterer Abschnitt dieser Untersuchung. Hierbei wurden Immunglobulin sezernierende Zellen mittels des reversen hämolytischen Plaque-Assays erfaßt. Vollständige Daten liegen von zehn Patienten vor. Tabelle 5 zeigt die einzelnen Ergebnisse. Die graphischen Darstellungen veranschaulichen die Veränderungen unter der Therapie bei jedem einzelnen Patienten (Abbildung 11) und vergleichen die Mittelwerte (Abbildung 12).

In drei Fällen sank die Anzahl der Immunglobulin sezernierenden Zellen unter der Cimetidintherapie. Dagegen kam es unter Cimetidintherapie siebenmal zu einem Anstieg. Dennoch läßt sich, der statistischen Analyse folgend, die Nullhypothese nicht verwerfen. Eine Modulation der durch Pokeweed-Mitogen induzierten Bildung Immunglobulin sezernierender Zellen unter Cimetidinwirkung läßt sich also nicht eindeutig statistisch belegen.

Patient Nr.	Immunglobulin sezernierende Zellen: vor der Therapie	unter der Therapie
1)	18400	15950
2)	6855	23850
3)	5600	8680
4)	5280	8160
5)	6050	14725
6)	14135	6435
7)	6890	14600
8)	5280	13695
9)	11700	8400
10)	10010	11050
Mittelwerte ± Standardabweichung	9020 ± 4243	12555 ± 4905

Tabelle 5: Ergebnisse des reversen hämolytischen Plaque-Assays vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. Angabe der Anzahl der Immunglobulin sezernierenden Zellen pro 10^6 in die Kultur gegebene Zellen. (Kulturdauer 6 Tage

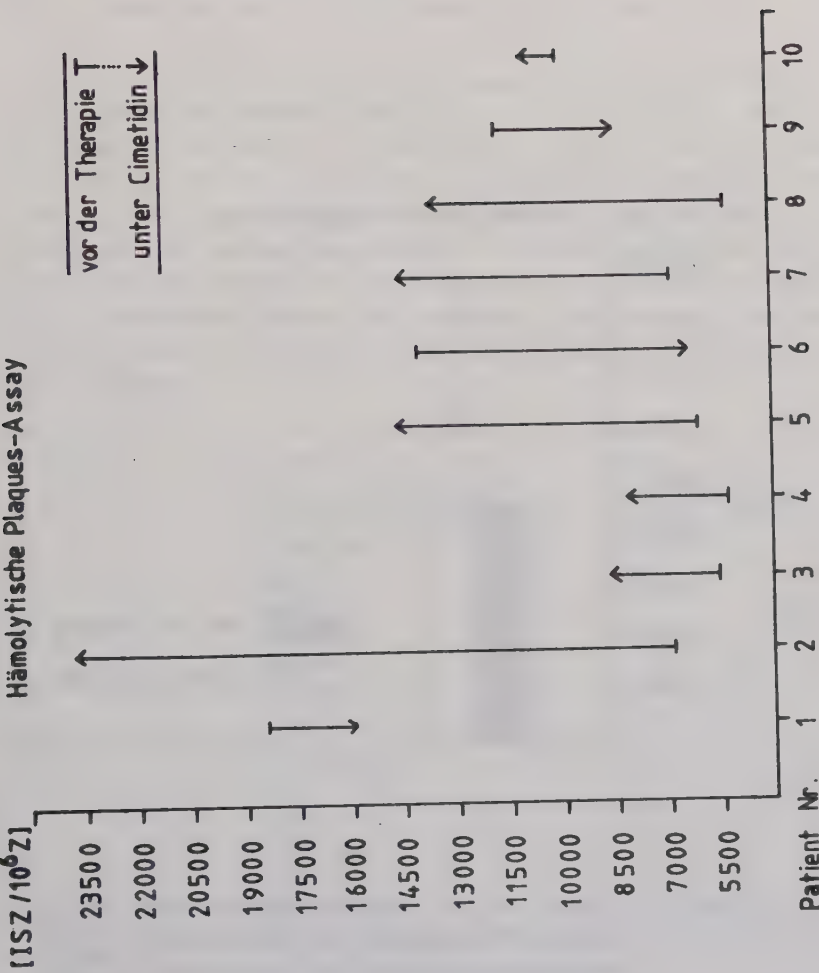


Abb. 11: Darstellung der Einzelergebnisse des reversen hämolytischen Plaque-Assays vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. Angabe der Immunglobulin sezernierenden Zellen pro 10^6 in Kultur gegebene Zellen. (Kulturdauer 6 Tage)

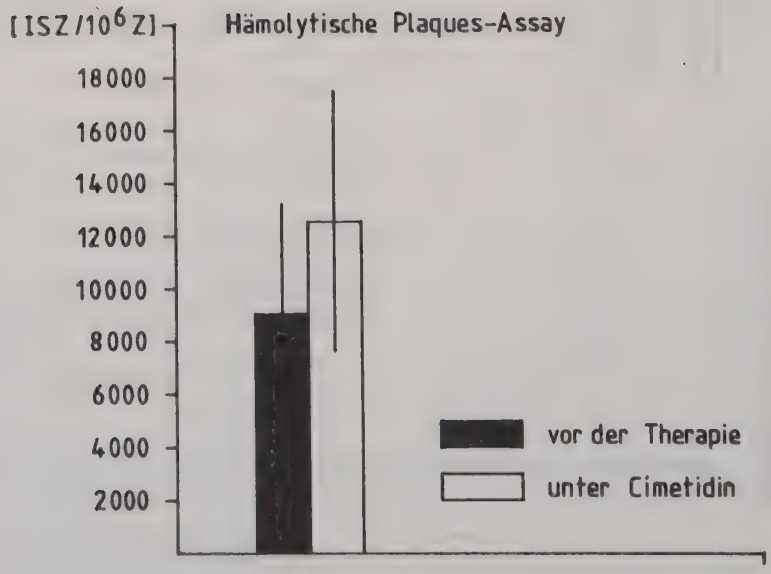


Abb. 12: Ergebnisse des reversen hämolytischen Plaque-Assays. Darstellung der Mittelwerte mit den Standardabweichungen vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie.

III.E. CIMETIDIN UND DIE PHYTHÄMAGGLUTININ-STIMULATION

Der Effekt einer Lymphozytenstimulation durch Phythämagglutinin (PHA) unter Cimetidintherapie ist in Abbildung 13 für jeden Patienten dargestellt. In Abbildung 14 stehen die Mittelwerte der Ergebnisse vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie nebeneinander. Die einzelnen Daten zeigt die folgende Tabelle 6. In sieben von neun Fällen kam es unter Cimetidin zu einem Anstieg der PHA-Antwort. Dieses Ergebnis spricht für einen die Stimulierbarkeit erhöhenden Einfluß des Cimetidin, jedoch läßt sich dies durch die statistische Analyse mit dem Wilcoxontest nicht eindeutig belegen.

Patient Nr.	vor der Therapie (Δcpm)	unter Cimetidin (Δcpm)
1)	58.340	62.343
2)	49.803	68.490
3)	60.377	57.366
4)	69.949	90.438
5)	57.001	58.490
6)	73.093	64.831
7)	54.830	69.744
8)	43.205	59.309
9)	50.807	57.422
Mittelwerte: ± Standardabweichung	57.489 ± 9.506	65.381 ± 10.476

Tabelle 6: Ergebnisse der H^3-Thymidininkorporation vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. Angabe der Δcpm von stimulierten und unstimulierten Zellkulturen bei 72 Stunden Gesamtkulturdauer.

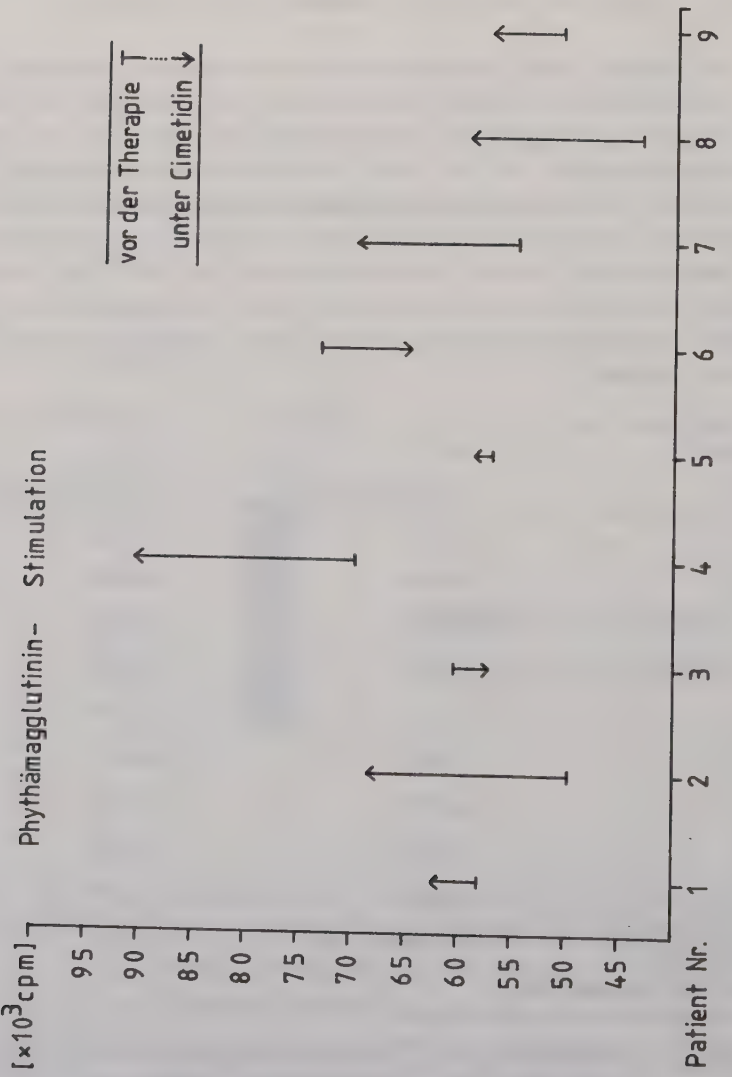


Abb. 13: Darstellung der Einzelergebnisse der H^3-Thymidin-Inkorporation vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. (Δ cpm von stimulierten und unstimulierten Zellkulturen bei 72 Stunden Gesamtkulturdauer)

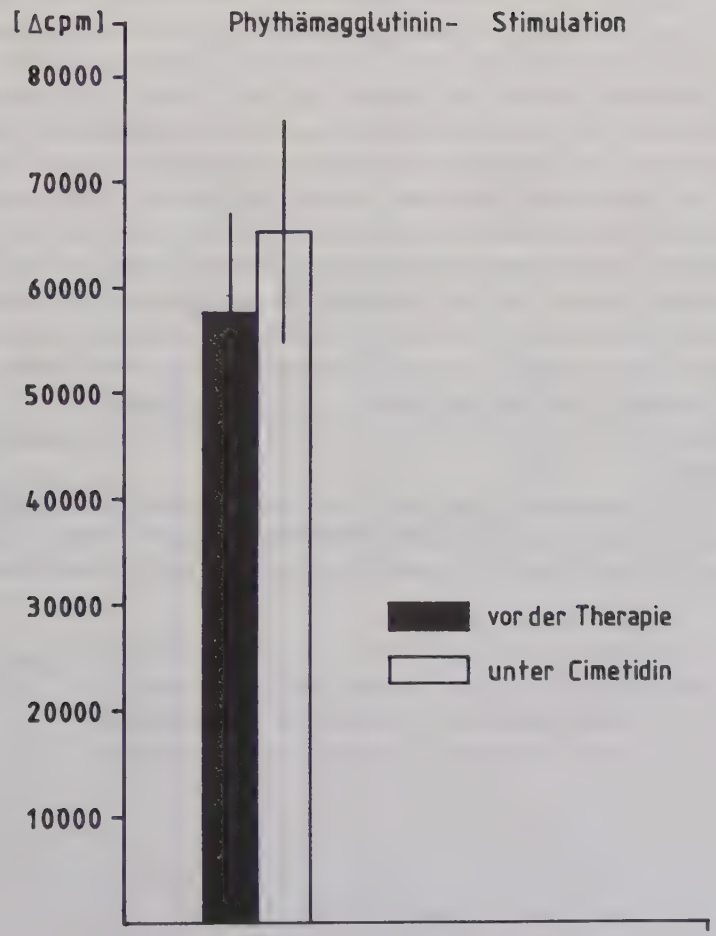


Abb. 14: Ergebnisse der H^3-Thymidininkorporation vor und am 28. Tag der Cimetidintherapie. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung.

III.F. EINFLUSS VON CIMETIDIN AUF DIE NK-FUNKTION IN VITRO

III.F.1. Ansatz nach fünf Stunden Vorinkubation der Effektorzellen mit Cimetidin

Wie die folgende Tabelle 7 und die Graphik in Abbildung 15 zeigen, liegen die Chromrelease-Werte und -Mittelwerte bei den mit Cimetidin vorinkubierten mononukleären Zellen niedriger, als bei den Kontrollen, die lediglich Kulturmedium im Vorinkubationsansatz hatten. Bei keinem von den zehn Blutspendern kam es zu einem Anstieg des Chromrelease bei Vorbehandlung der isolierten Zellen mit Cimetidin. Für eine Änderung in der Vitalität der mononukleären Zellen gab es, geprüft durch Trypanblaufärbung, keinen Anhalt. Cimetidin hat, bei fünfstündiger Vorinkubation mit den Konzentrationen 10^{-8}M, 10^{-6}M und 10^{-3}M einen hemmenden Effekt auf die NK-Funktion mononukleärer Zellen. Der zweiseitige Wilcoxontest für Paardifferenzen wurde für jede Konzentration angewandt. Die Alternativhypothese kann dabei in jedem der drei Ansätze bei einem 1 %-Niveau angenommen werden, das heißt, ein hemmender Effekt des Cimetidin läßt sich statistisch belegen.

Der Chromrelease war bei Cimetidin-Konzentrationen von 10^{-6}M weniger niedrig als bei den Konzentrationen 10^{-8}M und 10^{-3}M. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Spender Nr.	Cimetidinkonzentration 0	10^{-8}M	10^{-6}M	10^{-3}M
1)	29%	17%	28%	13%
2)	25%	18%	25%	10%
3)	28%	22%	24%	20%
4)	35%	27%	24%	20%
5)	26%	23%	23%	24%
6)	44%	14%	28%	34%
7)	32%	21%	21%	26%
8)	33%	21%	28%	21%
9)	38%	37%	32%	36%
10)	35%	31%	33%	32%
Mittelwerte:	33%	23%	27%	24%
Standardabw.:	±5,9	±6,9	±4,1	±8,6

Tabelle 7: NK-Funktion bei fünfstündiger Vorinkubation der mononukleären Zellen mit Cimetidin. Angabe des Chromrelease in Prozent. (Inkubationsdauer 18 Stunden, Effektor-Targetzellverhältnis 1:10)

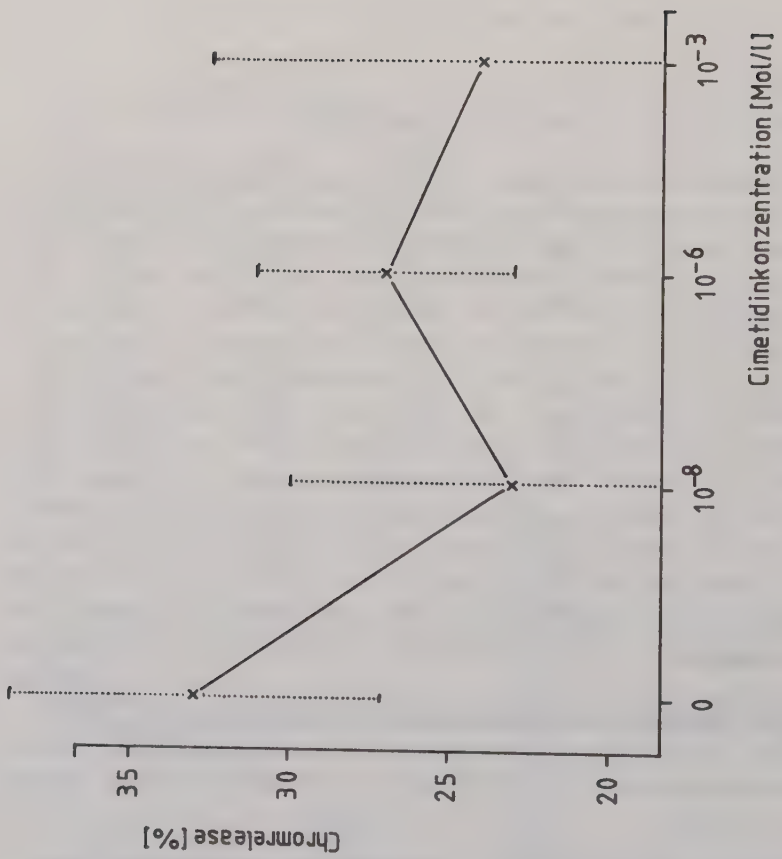


Abb. 15: NK-Funktion bei fünfstündiger Vorinkubation der mononukleären Zellen mit Cimetidin in drei Konzentrationen. Zugrundegelegt sind die arithmetischen Mittelwerte von 10 Spendern aus 4 Versuchen und die entsprechenden Standardabweichungen.

III.F.2. Cimetidin direkt im Ansatz

Die Ergebnisse, bei denen sich Cimetidin für die Gesamtdauer des Chromrelease-Assays von 18 Stunden in sechs verschiedenen Konzentrationen im Testansatz befand, zeigt die folgende Tabelle 8. Die Graphik (Abbildung 16) zeigt den Kurvenverlauf bei Auftragen der Mittelwerte.

Nur in 3 von 66 Messungen kam es nicht zu einer Erniedrigung des Chromrelease unter Cimetidin. In den Proben mit und ohne Cimetidin gab es keine Vitalitätsunterschiede (Trypanblaufärbung). Dieser Cimetidineffekt auf die NK-Funktion läßt sich statistisch bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % belegen. Die deutliche Hemmung bei der hohen Konzentration von 10^{-3}M wird im Rahmen der Diskussion zu interpretieren sein. Daß die Hemmung unter 10^{-3}M Cimetidin höher ist, als bei den anderen untersuchten Konzentrationen, läßt sich, mit Ausnahme der 10^{-8}M-Werte, statistisch bestätigen: Es wurden die Ergebnisse bei 10^{-3}M mit den entsprechenden Werten der jeweiligen Konzentration einzeln verglichen. Bei Anwendung des zweiseitigen Wilcoxontests für Paardifferenzen läßt sich auf dem 1 %-Niveau die Alternativhypothese annehmen. Bei den übrigen Konzentrationen erscheinen die Unterschiede im Chromrelease zueinander nicht erheblich. Sie erfahren statistisch auch keine Bestätigung.

Spender	Cimetidinkonzentrationen						
Nr.	0 M	10^{-8}M	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M	10^{-4}M	10^{-3}M
1)	24%	10%	20%	22%	7%	5%	8%
2)	27%	16%	23%	28%	13%	6%	2%
3)	36%	23%	29%	28%	28%	32%	27%
4)	41%	29%	30%	31%	36%	33%	16%
5)	28%	19%	21%	18%	22%	23%	16%
6)	42%	18%	20%	24%	25%	34%	13%
7)	35%	11%	7%	25%	14%	25%	11%
8)	49%	24%	24%	20%	21%	38%	7%
9)	29%	22%	25%	24%	15%	25%	26%
10)	34%	30%	38%	27%	33%	32%	8%
11)	33%	30%	29%	31%	28%	33%	27%
Mittelwerte:	34%	21%	24%	25%	22%	26%	15%
Standardabw:	±7,4	±7,1	±7,8	±4,2	±9,3	±11,1	±7,9

Tabelle 8: NK-Funktion bei Anwesenheit von Cimetidin in unterschiedlicher Konzentration während der Gesamtdauer des Chromrelease-Assays. Angabe des Chromrelease in Prozent. (Inkubationsdauer 18 Stunden, Effektor-Targetzellverhältnis 1:10)

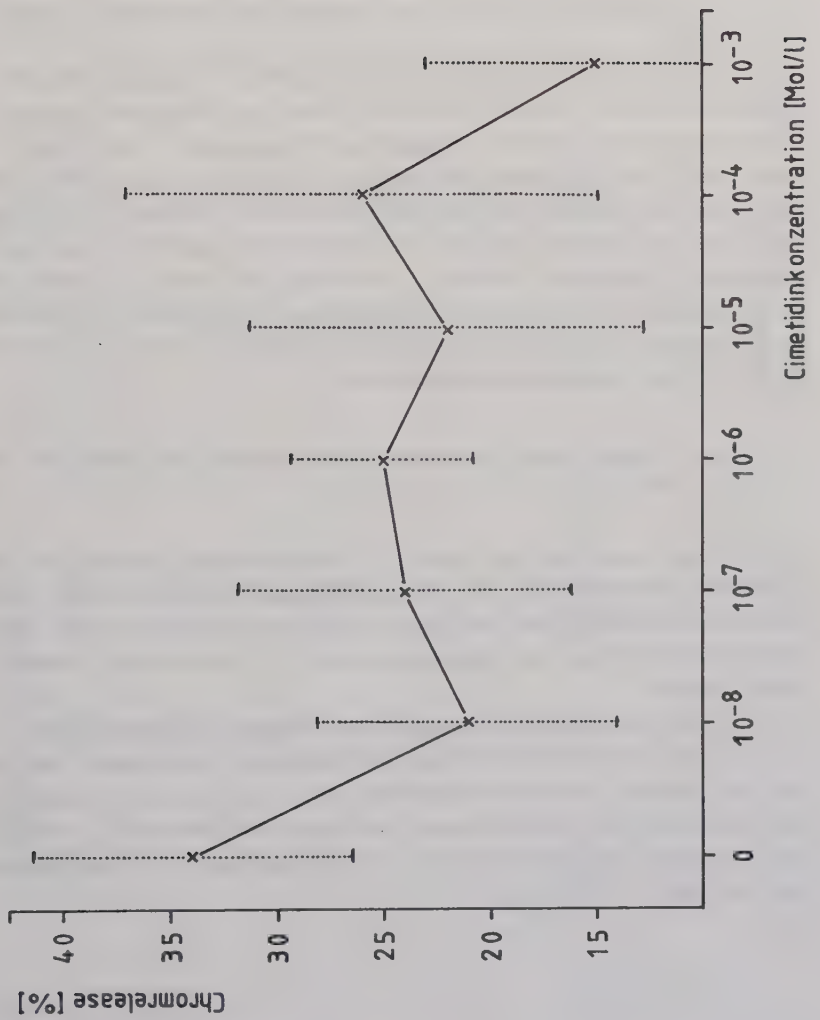


Abb. 16: NK-Funktion bei Anwesenheit von Cimetidin in unterschiedlicher Konzentration während der Gesamtdauer des Chromrelease-Assays. Zugrunde gelegt sind die arithmetischen Mittelwerte der Meßergebnisse von 11 Spendern aus 4 Versuchen und die entsprechenden Standardabweichungen.

III.F.3. Cimetidin direkt vier Stunden vor Testende im Ansatz

Die folgende Tabelle 9 und die Graphik 17 zeigen die Ergebnisse, bei denen Cimetidin vier Stunden vor Ende des Chromrelease-Assays dem Ansatz hinzugefügt wurde. Dabei kam es bei sechs von sechsundsechzig Messungen nicht zu einer Hemmung der NK-Funktion. Dennoch läßt sich statistisch auf dem 5 %-Niveau für jede der Konzentrationen die Alternativhypothese annehmen. Das heißt, Cimetidin hemmte die NK-Funktion auch in diesem Versuchsabschnitt. Konzentrationsabhängige Unterschiede im Ausmaß der Hemmung liegen hier, statistisch belegt, bei keiner der benutzten Cimetidinkonzentrationen vor.

III.F.4. Ansatz nach 5 Stunden Vorinkubation der Targetzellen mit Cimetidin

Analoge Versuche wie unter F.1. dargestellt, wurden in Vorversuchen durchgeführt, in denen nicht die Effektorzellen (Mononukleäre periphere Blutzellen), sondern die Targetzellen (K 562) einer fünfstündigen Vorinkubation mit 10^{-6}M Cimetidin unterzogen wurden.

Vor der endgültigen Einbeziehung dieser vorinkubierten Zellen in dem NK-Assay wurden sie 3 Waschungen unterzogen, um potentiell nicht gebundenes Cimetidin aus der Kultur zu entfernen. Unter diesen Bedingungen ließ sich im Vergleich zu nicht mit Cimetidin Vorinkubierten (in Kulturmedium) kein veränderter Chromrelease feststellen.

Spender Nr.	Cimetidinkonzentrationen 0 M	10^{-8}M	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M	10^{-4}M	10^{-3}M
1)	18%	16%	17%	19%	12%	15%	16%
2)	20%	5%	20%	23%	16%	17%	8%
3)	37%	31%	30%	36%	26%	33%	26%
4)	41%	28%	23%	32%	31%	29%	35%
5)	23%	13%	19%	13%	18%	22%	14%
6)	39%	45%	34%	33%	28%	25%	21%
7)	31%	32%	27%	29%	25%	25%	21%
8)	26%	14%	13%	11%	12%	16%	21%
9)	49%	30%	19%	37%	33%	19%	38%
10)	36%	35%	36%	31%	34%	34%	35%
11)	46%	37%	40%	39%	30%	47%	43%
Mittelwerte:	33%	26%	25%	28%	24%	26%	25%
Standardabw.:	± 10,0	± 11,7	± 8,4	± 9,2	± 7,8	± 9,2	± 10,6

Tabelle 9: NK-Funktion bei Einwirkung des Cimetidin in unterschiedlicher Konzentration während der letzten 4 Stunden des Chromrelease-Assays. Angabe des Chromrelease in Prozent. (Inkubationsdauer 18 Stunden, Effektor-Targetzellverhältnis 1:10)

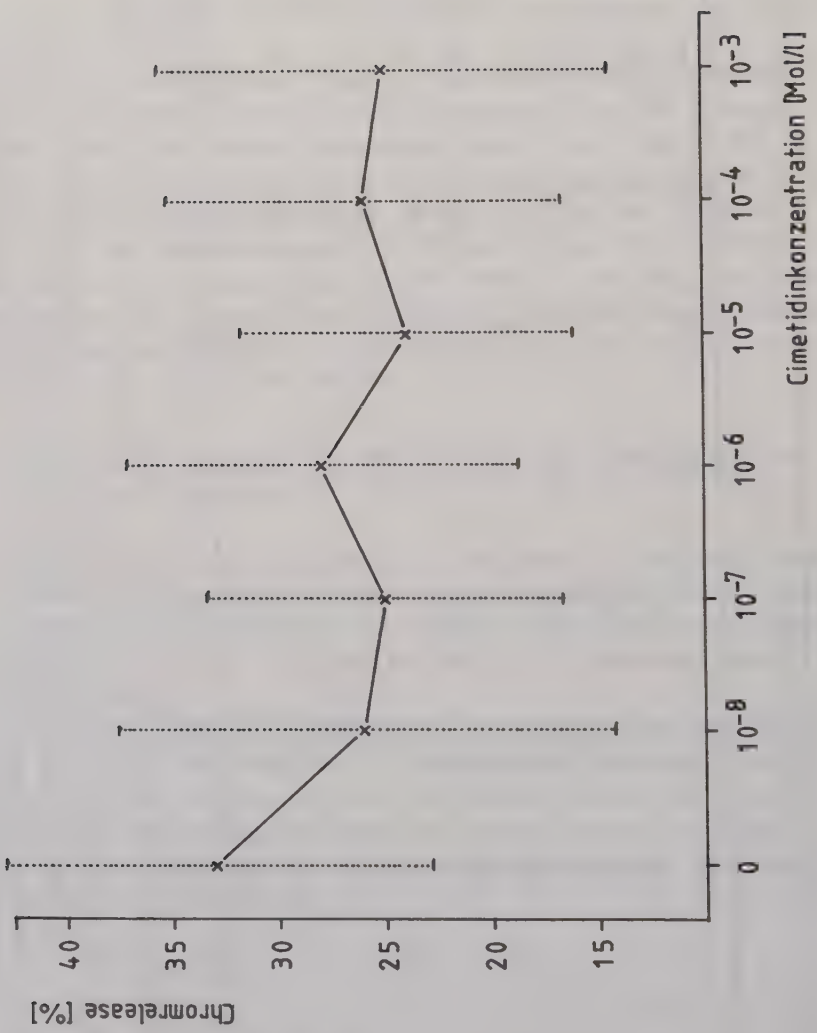


Abb. 17: NK-Funktion bei Einwirken von Cimetidin in unterschiedlicher Konzentration während der letzten 4 Stunden des Chromrelease-Assays. Zugrunde gelegt sind die arithmetischen Mittelwerte der Meßergebnisse von 11 Spendern aus 4 Versuchen und die entsprechenden Standardabweichungen.

III.G. EINFLUSS VON CIMETIDIN AUF DEN REVERSEN HÄMOLYTISCHEN PLAQUE-ASSAY IN VITRO

III.G.1. Vorinkubation mit Cimetidin für 24 Stunden

In drei Versuchen wurden die mononukleären Zellen mit Cimetidin unterschiedlicher Konzentration, beziehungsweise mit Kulturmedium als Kontrolle für 24 Stunden vorinkubiert. Die Ergebnisse der anschließenden Kultur mit Pokeweed-Mitogen und dem reversen Hämolytischen Plaques-Assay zeigt die Tabelle 10.

Konzentrationsabhängig kam es unter Cimetidin zu einer gesteigerten Differenzierung Immunglobulin sezernierender Zellen. Dieser Effekt ist um so höher, je stärker die Konzentration von Cimetidin im Vorinkubationsansatz war.

Wie der Tabelle 11 zu entnehmen ist, zeigten die jeweiligen Ansätze ohne Pokeweed-Mitogen keine Beeinflussung durch Cimetidin, so daß eine eigen-mitogene Wirkung des Cimetidin selbst ausgeschlossen werden kann.

Nach der Vorinkubation war die Vitalität der mit Cimetidin behandelten Zellen gleich der von unbehandelten Suspensionen und lag über 95 % (Trypanblaufärbung).

Versuch:	A	B	C
ohne Cimetidin	5740	5210	3760
Cimetidin 10^{-8}M	6600	8710	3785
" 10^{-6}M	9900	7285	7500
" 10^{-3}M	11720	12530	8695
	(Immunglobulin sezernierende Zellen pro 10^6 Zellen vor der Kultur)		

Tabelle 10: Der Einfluß von Cimetidin auf die Bildung von Immunglobulin sezernierenden Zellen im reversen hämolytischen Plaque-Assay. Ergebnisse aus 3 Versuchen bei Vorinkubation der mononukleären Zellen mit Cimetidin für 24 Stunden.
(Mittelwerte aus Doppelansätzen, Kulturdauer 6 Tage)

Kontrollansätze ohne Pokeweed-Mitogen			
Versuch:	A	B	C
ohne Cimetidin	700	420	770
Cimetidin 10^{-8}M	320	120	500
" 10^{-6}M	180	180	330
" 10^{-3}M	540	630	600
	(Immunglobulin sezernierende Zellen pro 10^6 Zellen vor der Kultur)		

Tabelle 11: Der Einfluß von Cimetidin auf die Kontrollansätze des reversen hämolytischen Plaque-Assay ohne Pokeweed-Mitogen-Stimulation. Ergebnisse aus 3 Versuchen bei Vorinkubation der mononukleären Zellen mit Cimetidin für 24 Stunden.
(Kulturdauer 6 Tage)

III.G.2. Cimetidin direkt im Kulturansatz

Es wurden zwei Versuche durchgeführt, in denen sich Cimetidin oder bei den Kontrollen Medium direkt in dem fünftägigen Kulturansatz befanden. Die Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle 12. Eine verstärkte Bildung von Immunglobulin sezernierenden Zellen ist nicht zu verzeichnen. Bei einer Cimetidin-Konzentration von 10^{-3}M ist im Gegenteil die Anzahl der Plaques deutlich geringer. Die Zellzahl in den Kulturen hatte sich bei allen Ansätzen im gleichen Maße erhöht. Die Proliferation war folglich nicht durch Cimetidin gehemmt. Die Trypanblau-Probe zeigte keine Unterschiede in der Vitalität der Zellen mit oder ohne Cimetidinzusatz und unterschritt nicht 90 %, so daß eine toxische Wirkung des Cimetidin auszuschließen ist.

Immunglobulin sezernierende Zellen pro 10^6 Zellen vor der Kultur		
Versuch:		
ohne Cimetidin	5085	4930
Cimetidin 10^{-8}M	4920	5225
" 10^{-6}M	5010	4825
" 10^{-3}M	2750	2800
Zellzahlen nach der sechstägigen Kultur		
Versuch:		
ohne Cimetidin	$1{,}2 \times 10^6$/ml	$2{,}0 \times 10^6$/ml
Cimetidin 10^{-8}M	$1{,}2 \times 10^6$/ml	$1{,}9 \times 10^6$/ml
" 10^{-6}M	$1{,}3 \times 10^6$/ml	$1{,}7 \times 10^6$/ml
" 10^{-3}M	$1{,}1 \times 10^6$/ml	$1{,}9 \times 10^6$/ml

Tabelle 12: Der Einfluß von Cimetidin auf die Bildung von Immunglobulin-sezernierenden Zellen im reversen hämolytischen Plaque-Assay. Ergebnisse aus zwei Versuchen bei Anwesenheit von Cimetidin im Kulturansatz während der Gesamtkulturdauer von 6 Tagen. Angabe der Immunglobulin-sezernierenden Zellen pro 10^6 Zellen vor der Kultur und den Zellzahlen nach der Kultur. (Mittelwerte aus Doppelansätzen)

IV. DISKUSSION

Das Immunsystem ist wesentlich involviert in die Verhinderung und Abwehr von Infektionen und malignen Erkrankungen. Bei normaler Funktionslage verteidigt es den Körper gegen Fremdorganismen, wie Bakterien und Viren, und gegen neoplastisch transformierte Zellen. Eine Fehlfunktion des Immunsystems führt zu Krankheit, in aller Regel als Infektion oder Neoplasie klinisch manifestiert. Ziel der Immunologie ist, Kenntnisse über die zelluläre Zusammensetzung des Immunsystems, seine Funktionen und Regulationsabläufe zu schaffen mit der Implikation neuer therapeutischer Möglichkeiten.

Chemische Substanzen, die in der Lage sind, die Rekrutierung von immunkompetenten Zellen und deren Funktion zu beeinflussen, sind dabei von großem Interesse. Zum einen können sie benutzt werden, um Einblick in die Funktionsweise des Immunsystems an sich zu bekommen, besonders, wenn es sich um natürlich im Körper wirkende Substanzen oder deren Antagonisten handelt. Zum anderen bieten sie die Möglichkeit, die Aktion des Immunsystems in therapeutischem Sinne zu modulieren.

Durch Hinweise auf die Existenz voin Histamin-H_2-Rezeptoren an Lymphozyten (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23) erlangt Cimetidin als H_2-Rezeptoren-Blocker eine Bedeutung für immunologische Untersuchungen.

In der vorliegenden Studie wurden mehrere wesentliche immunologische Parameter auf ihre Beeinflußbarkeit durch Cimetidin in vitro und in vivo untersucht und ausgewertet.

Hinsichtlich der peripheren Leukozytenzahl und der absoluten Zahl der Lymphozyten und Monozyten gab es keine Hinweise für eine Veränderung unter der Therapie mit Cimetidin. Peden et al. (27) berichten in einer Untersuchung an 33 Patienten von einem Abfall der Leukozytenzahlen unter Cimetidintherapie. Die Leukozytenzahl sank dabei im Mittel von 8.1 G/l auf 6.5 G/l und blieb dabei durchaus im Bereich des Normalen.

Bei Peden et al., wie den eigenen Untersuchungen, trat keine Veränderung der absoluten Lymphozytenzahl auf. Dies steht

im Einklang mit weiteren Veröffentlichungen von Robertson et al. (24), Festen et al. (25) und Raptopoulou et al. (26).

Der Anteil von E_N-Rosetten-, OKT 4-, OKT 8-, L 243- und BA 1-markerpositiven Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl blieb unter Cimetidintherapie unbeeinflußt. Hierzu liegt, außer einer Untersuchung über den T-Lymphozytenanteil mit E-Rosetten, keine vergleichbare Veröffentlichung vor: Raptopoulou et al. (26) berichten von einer unveränderten Zahl von T-Lymphozyten. Dabei wurde ebenfalls der Rosettentest mit Schafserythrozyten angewandt. Bei den hier vorliegenden Daten läßt sich aussagen, daß die Subpopulationsanteile mononukleärer Zellen im peripheren Blut unter Cimetidintherapie in weitem Ausmaß konstant bleiben.

Dies trifft allerdings nicht auf die mit OKM-1 und Leu 7- (= HNK 1) reagierenden Zellen zu, bei denen eine Verminderung eintrat. Interpretationsmöglichkeiten sind, daß Cimetidin lediglich eine Umverteilung dieser Zellen im Körper vom zirkulierenden Pool zu Gunsten des Gewebepools induzieren mag oder alternativ, daß Cimetidin tatsächlich die Gesamtzahl der entsprechenden Zellen verringert hat (z.B. durch inhibierte Differenzierung in Zellen mit diesem Phänotyp oder durch induzierte Differenzierung in Zellen, die diesen Phänotyp bereits verloren haben). Welche dieser Möglichkeiten eingetreten ist, und ob dies eine Wirkung des Cimetidins vermittelt über H_2-Rezeptoren darstellt, muß auf Grund der vorliegenden Untersuchung noch offen bleiben.

In letzter Zeit ist es gelungen, die NK-Effektorzellen näher zu charakterisieren (54, 56, 61). Danach scheinen die NK-Zellen mit zunehmender Ausreifung phänotypischen Änderungen zu unterliegen. Die Befunde lassen sich insbesondere so interpretieren, daß die reife NK-Zelle sowohl Leu 7-positiv, als auch OKM 1-positiv ist. Somit kann vermutet werden, daß der in dieser Studie gezeigten gleichzeitigen Abnahme der Leu 7- und OKM 1-reagiblen Zellpopulationsanteile eine Verminderung der reifen NK-Zellen im peripheren Blut zu Grunde liegen mag.

Bei der Untersuchung der Cimetidinwirkung auf die cytotoxische NK-Funktion der mononukleären Zellen in vitro zeigte sich

eine deutliche Hemmung der cytotoxischen NK-Aktivität, die in ihrem Ausmaß sowohl bei der Vorinkubation mit Cimetidin, als auch bei der Anwesenheit von Cimetidin während des Chromrelease-Assays vergleichbar war. Dabei zeigte sich keine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung. Lediglich bei der sehr hohen Konzentration von 10^{-3}M und wenn Cimetidin während der Gesamtdauer des Chromrelease-Assays wirken konnte, trat eine Hemmung der NK-Aktivität auf, die signifikant höher war, als bei allen anderen Konzentrationen und Ansätzen. Wenn Cimetidin für eine Endkonzentration von 10^{-3}M erst im späteren Verlauf für die letzten 4 Stunden des Assays hinzugefügt wurde, fehlte dieser Effekt. Diese beiden Beobachtungen stimmen überein mit denen von Ruiz-Arguelles et al. (39). In dessen Untersuchung konnte zusätzlich demonstriert werden, daß bei diesen hohen Cimetidinkonzentrationen (10^{-2}M und 10^{-3}M) eine erhebliche Stoffwechselaktivierung der K 562-Targetzellen stattfand. Diese Stoffwechselaktivierung hat vermutlich in der Initialphase der NK-Zellyse einen protektiven Effekt für die Targetzellen. Im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen steht die von Ruiz-Arguelles et al. beschriebene Dosisabhängigkeit der Cimetidinwirkung auf die NK-Funktion. Auch Lang et al. (40) berichten von einer dosisabhängigen Hemmung. Allerdings trat eine Hemmung dort erst bei Cimetidinkonzentrationen höher als 1.6×10^{-5}M auf. Unterschiede in der Methodik könnten die Ursache für diese Diskrepanzen sein.

Es ist zu fragen, über welchen Mechanismus das Cimetidin seine hemmende Wirkung entfaltet. Die Tatsache, daß die Hemmung durch Histamin antagonisiert wird und die Art und Weise, in der dieser Antagonismus stattfindet (39, 40), spricht für eine Wirkung des Cimetidin über H_2-Rezeptoren. Da die Cimetidinwirkung aber auch ohne Anwesenheit von Histamin im Chromrelease-Ansatz vorhanden ist, sie also nicht nur als eine Blockierung einer Histaminwirkung gesehen werden kann, hat Cimetidin möglicherweise, ob über H_2-Rezeptoren vermittelt oder auch nicht, eine intrinsische Aktivität.

Bei den mit Cimetidin behandelten Patienten traten im Verlauf der Therapie niedrigere NK-Aktivitäten auf. Sowohl der parallel beobachtete Rückgang der Leu 7- und OKM 1-markerpositiven Zellen, dem vermutlich eine Verminderung der reifen

NK-Effektorzellen im peripheren Blut zu Grunde liegt, als auch der in in-vitro-Versuchen beobachtete hemmende Cimetidin-Effekt auf die cytotoxische NK-Funktion können mit diesem Phänomen in Zusammenhang gebracht werden. Es ist naheliegend, daß das Cimetidin zum Einen über eine Verminderung der im peripheren Blut zur Verfügung stehenden reifen NK-Zellen, zum Anderen über eine Hemmung der NK-Funktion dieser Zellen bei den Patienten eine Verminderung der NK-Aktivität bewirkt haben kann.

Die NK-Funktion scheint ein wesentlich begrenzender Faktor bei der Entstehung und dem Wachstum von neoplastischen Tumoren zu sein (73). Da Cimetidin in dieser Untersuchung einen mindernden Effekt auf die NK-Funktion ausgeübt hat, könnte vermutet werden, daß dadurch Tumorentstehung und Tumorwachstum begünstigt werden. Im Gegensatz zu dieser Vermutung stehen Veröffentlichungen, die unter Cimetidinbehandlung von zurückgebildeten Metastasen in zwei Fällen (48) von verlangsamtem Tumorwachstum und Metastasenwachstum bei experimentell mit Tumorzellen inokulierten Mäusen berichten (47, 48). Dieser Widerspruch läßt sich erklären, wenn man berücksichtigt, daß an der Abwehr maligner Tumoren außer den NK-Zellen auch andere beteiligt sind (76).

Ausführliche Studien von Plaut et al. im Mäusesystem und beim Menschen (9, 22, 23) zeigen, daß cytotoxische T-Lymphozyten H_2-Rezeptoren besitzen, die durch Histamin gehemmt werden können und diese Hemmung durch H_2-Blocker verhindert werden kann. Bei Gifford et al. (47) war einer der im Wachstum gehemmten malignen Tumoren ein Fibrosarkom, das als NK-Resistent gilt. In Kenntnis dieser Tatsachen erscheint es möglich, daß Cimetidin zwar die NK-Aktivität erniedrigt, daß aber durch die gleichzeitige verstärkte Aktivierung des cytotoxischen T-Lymphozytensystems netto dennoch ein behindertes Tumorwachstum resultiert.

Die Berichte über Cimetidineffekte bei Transplantatüberlebenszeiten (41, 42, 43, 45) sind widersprüchlich, und ergänzende in-vitro und in-vivo-Untersuchungen auf die Effekte von Cimetidin auf Alloreaktivität sind angezeigt.

Bei Mitogenstimulation der mononukleären Zellen mit Pokeweed-Mitogen und Phythämagglutinin kam es, wenn auch nicht statistisch eindeutig abzusichern, zu einer verstärkten Proliferation, beziehungsweise zu einer vermehrten Bildung von Immunglobulin sezernierenden Zellen. Dabei bestätigen die in-vitro-Ansätze im Prinzip die in-vivo-Verhältnisse. Der Versuchsabschnitt, bei dem sich Cimetidin in der Pokeweed-Mitogenstimulierten Kultur befand, entspricht dabei nicht dem in-vivo Ansatz, da dort gewaschene mononukleäre Zellen in den Kulturansatz gegeben wurden und daher kein Cimetidin während der Kultur anwesend war. Der bei diesem zweiten in-vitro Ansatz nicht erfolgte Anstieg von Immunglobulin sezernierenden Zellen ist daher nicht im Widerspruch zu den in-vivo Ergebnissen.

Für den steigernden Effekt des Cimetidin auf die Ergebnisse der Mitogenstimulationen mit Pokeweed-Mitogen und Phythämagglutinin ist in erster Linie eine Modulation des Netzwerkes der Lymphozyteninteraktionen anzunehmen, da eine Verschiebung der quantitativ erkennbaren Lymphozytensubpopulationen, die für die Steuerung von Proliferation und Antikörperproduktion verantwortlich sind, entsprechend der Membranmarkeruntersuchungen nicht erkennbar war. Folgende Wirkmechanismen für das Cimetidin bei einer Beeinflussung der Lymphozytenfunktion sind dabei denkbar:

a) eine Inhibierung von Suppressoreffektorzellen direkt
b) eine Inhibierung von Suppressor-Inducer-Zellen, woraufhin eine Aktivierung von Suppressoreffektorzellen nicht stattfindet
c) eine Aktivierung von Helfer-T-Lymphozyten
d) ein direkter Effekt auf die B-Zellen

Die letztgenannte Möglichkeit ist wenig wahrscheinlich, da bei dem in-vitro Ansatz, bei dem sich Cimetidin während der Zellkultur im Rahmen des reversen Hämolytischen Plaques-Assays, also während der Ausdifferenzierung von Immunglobulin sezernierenden Zellen aus B-Zellen, im Ansatz befand, keine gesteigerte Bildung von Immunglobulin sezernierenden Zellen stattfand und sogar zum Teil vermindert solche Zellen entstanden, bei Ausschluß eines toxischen Effekts des Cimetidin.

Es handelt sich also bei der Beeinflussung der Phythämagglutinin-Stimulation und Pokeweed-Mitogen-Stimulation durch Cimetidin offenbar um eine Beeinflussung des T-Zellsystems. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stehen Veröffentlichungen, die bei mononukleären Zellen von Patienten unter Cimetidintherapie eine verstärkte proliferative Reaktion auf Phythämagglutininstimulation (24, 27, 34) und auf Pokeweed-Mitogen und Concanavalin-A fanden (27). Bestätigend wurden im Mäusesystem unter Cimetidinbehandlung eine vermehrte Bildung von Immunglobulin sezernierenden Zellen auf Injektion von Schafserythrozyten als Antigen (30) und eine vermehrte Antikörperproduktion, sowohl von IgM und auch von IgG, auf Gabe von Tetanustoxoid beschrieben (31).

Die verstärkte Antwort der mononukleären Zellen unter Cimetidintherapie auf Pokeweed-Mitogen- und Phythämagglutinin-Stimulation läßt sich auf eine funktionelle Beeinflussung des T-Zellsystems zurückführen. Bei den in-vitro Ansätzen, bei denen die mononukleären Zellen mit Cimetidin vorinkubiert wurden - diese Ansätze entsprechen vom Prinzip her dem in-vivo Ansatz - war kein Histamin im Ansatz, und dennoch gab es die verstärkte Bildung von Immunglobulin sezernierenden Zellen. Auch hier sprechen, wie schon bei den Testen zur Beeinflussung der NK-Funktion, die Ergebnisse für eine mögliche intrinsische Wirkung des Cimetidin, die nicht über klassische H_2-Rezeptoren vermittelt zu sein braucht. Diese Interpretation der Befunde wird gestützt durch die Ergebnisse von Peden et al. (27). Dort wurden mononukleäre Zellen von Patienten, die mit Cimetidin oder Ranitidin behandelt wurden, mit Concanavalin-A, Pokeweed-Mitogen und Phythämagglutinin stimuliert. Nur bei der mit Cimetidin behandelten Gruppe gab es eine gesteigerte proliferative Reaktion, nicht aber bei der mit Ranitidin behandelten. Wenn die Cimetidinwirkung auf die mononukleären Zellen über klassische H_2-Rezeptoren vermittelt wäre, müßte Ranitidin, das ja als H_2-Rezeptoren-Blocker wie Cimetidin an denselben H_2-Rezeptoren wirkt, denselben Effekt gehabt haben. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob sich diese Vermutung einer intrinsischen Wirkung von Cimetidin bestätigen läßt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung untermauern die Bedeutung des Cimetidin für die zelluläre Immunologie. Es bleibt abzuwarten, ob Cimetidin oder verwandte Substanzen mit zunehmendem Wissen um Tumorimmunität, Autoimmunität und Infektabwehr eine Rolle als Immunomodulatoren einnehmen werden.

Für die Beurteilung einer immunomodulatorischen Funktion von Cimetidin und besonders deren Bedeutung für den Gesamtorganismus bedarf es auf Grund der Komplexität des Immunsystems vieler Erkenntnisse, die das gesamte Spektrum dieses Systems betreffen. Hierzu mag diese Arbeit beigetragen haben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mehrere Studien weisen auf die Existenz von Histamin-H_2-Rezeptoren an Lymphozyten hin. Dies macht H_2-Rezeptorenblocker wie das Cimetidin zu einer für die Immunologie interessanten Substanz, mit deren Hilfe einerseits der modulierende Einfluß des Gewebshormons Histamin auf die Immunreaktion untersucht werden kann, andererseits möglicherweise immunotherapeutische Wirkungen erzielt werden können.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene immunologische Parameter auf ihre Beeinflußbarkeit durch Cimetidin in-vivo und in-vitro untersucht.

Subpopulationen mononukleärer Zellen im peripheren Blut zeigten unter Cimetidintherapie morphologisch wie immunologisch (Untersuchungen von Zellinien-assoziierten Oberflächenantigenen) nur im Hinblick auf die Zahl zirkulierender NK-Zellen signifikante Veränderungen.

Mononukleäre Zellen von gesunden Blutspendern wurden durch Vorinkubation mit oder durch direkte Einwirkung von Cimetidin in ihrer cytotoxischem NK-Aktivität, geprüft durch einen $Chrom^{51}$-Release-Assay, dosisunabhängig gehemmt.

Entsprechend nahm auch die cytotoxische NK-Aktivität mononukleärer Zellen von Patienten, die mit Cimetidin behandelt wurden, unter der Therapie ab.

Sowohl die Verminderung funktionsfähiger NK-Zellen im peripheren Blut unter Cimetidintherapie, als auch die in-vitro gezeigte funktionelle Minderung der NK-Aktivität durch Cimetidin können hierfür ursächlich sein.

Mononukleäre Zellen von mit Cimetidin behandelten Patienten wurden zudem mit Mitogenen stimuliert. Dabei zeigten die Zellen unter der Therapie eine verstärkte proliferative Antwort auf Phythämagglutinin, gemessen als gesteigerte H^3-Thymidininkorporation und eine gesteigerte Differenzierung in Immunglobulin sezernierenden Zellen auf Pokeweed-Mitogen, erfaßt im reversen hämolytischen Plaque-Assay. Zusätzliche Studien mit Spenderlymphozyten zur in-vitro-Wirkung von Cimetidin im reversen

hämolytischen Plaque-Assay legen nahe, daß Cimetidin durch eine Modulation der Aktivität von T-Lymphozytensubpopulationen eine verstärkte Mitogenantwort auf Phythämagglutinin und Pokeweed-Mitogen induziert.

Bei den in-vitro-Versuchen mittels des $Chrom^{51}$-Release-Assays und des reversen hämolytischen Plaque-Assays kann eine Histaminwirkung weitgehend ausgeschlossen werden. Der Einfluß, den Cimetidin in diesen Versuchen auf die mononukleären Zellen ausgeübt hat, kann deswegen nicht als ein Histaminantagonismus durch Blockierung von H_2-Rezeptoren erklärt werden. Daher wird eine intrinsische Wirkung von Cimetidin postuliert. Zukünftige Studien, besonders Vergleiche mit anderen H_2-Blockern sollten dokumentieren, ob sich eine solche intrinsische Wirkung des Cimetidin bestätigen läßt.

VI. QUELLENVERZEICHNIS

1.) BARGER, G.
DALE, H.H. - The presence in ergot and physiological activity of β-imidazolethylamine, J.Physiol. (London), 1910, 40, 38-40

2.) BOVET, D.
STAUB, A.M. - Action protectrice des éthers phénoliques au cours de l'intoxication histaminique, C.R. Soc.Biol. (Paris), 1937, 124, 547-549

3.) ASH, A.S.F.
SCHILD, H.O. - Receptors mediating some actions of histamine, Br.J.Pharmacol.Chemother., 1966, 27, 427-439

4.) BLACK, J.W.
DUNCAN, W.A.M.
et al. - Definition and antagonism of histamine H_2-Receptors, Nature, 1972, 236, 385-390

5.) BLACK, J.W.
DUNCAN, W.A.M.
et al. - Metiamide - an orally active histamine H_2-receptor antagonist, Agents Actions, 1973, 3, 133-137

6.) BRIMBLECOMBE, R.W.
DUNCAN, W.A.M.
et al. - Cimetidine - a non-thiourea H_2-receptor antagonist, J.Int.Med.Res., 1975, 3, 86-92

7.) MELMON, K.L.
BOURNE, H.R.
et al. - Receptors for histamine can be detected on the surface of selected leucocytes, Science, 1972, 177, 707-709

8.) SHEARER, G.M.
WEINSTEIN, Y.
et al. - Enhancement of immune response potential of mouse lymphoid cells fractionated over insolubilized conjugated histamine columns, J.Immunol., 1974, 113/2, 597-607

9.) PLAUT, M.
LICHTENSTEIN, L.M.
et al. - Properties of a subpopulation of T-cells bearing histamine receptors, J.Clin.Invest., 1975, 55, 856-874

10.) EICHMANN, U. - Idiotype suppression - II. Amplification of a suppressor T cell with anti-idiotopic activity, Eur.J.Immunol., 1975, 5, 511-517

11.) BRODEUR, B.R. WEINSTEIN, Y. et al. - Reciprocal changes in interferon production and immune responses of mouse spleen cells fractionated over columns of insolubilized conjugates of histamine, Cell.Immunol., 1977, 29, 363-372

12.) SCHECHTER, B. SEGAL, S. et al. - Enhancing lymphocytes in spleens of tumorbearing mice: affinity chromatography on insolubilized histamine, Int.J.Cancer, 1977, 20, 239-246

13.) SCHECHTER, B. SEGAL, S. et al. - Generation of suppressor lymphocytes during sensitation in culture against a syngeneic tumor: affinity chromatography on insolubilized histamine, J.Immunol., 1978, 120/4, 1268-1273

14.) ROCKLIN, R.E. GREINEDER, D.K. et al. - Histamine-induced suppressor faktor (HSF): Further studies on the nature of the stimulus and the cell which produces it, Cell-Immunol., 1979, 44, 404-415

15.) LIMA, M. ROCKLIN, R.E. - Histamine modulates in vitro IgG production by pokeweed mitogen-stimulated human mononuclear cells, Cell.Immunol., 1981, 64, 324-336

16.) ROCKLIN, R.E. - Histamine-induced suppressor factor (HSF): Effect on migration inhibitory factor (MIF) production and proliferation, J.Immunol., 1977, 118/5, 1734-1738

17.) ROCKLIN, R.E. BREARD, J. et al. - Characterization of the human blood lymphocytes that produce a histamine-induced suppressor factor (HSF), Cell.Immunol., 1980, 51, 226-237

18.) ROCKLIN, R.E. - Modulation of cellular-immune responses in vivo and in vitro by histamine receptor-bearing lymphocytes, J.Clin.Invest., 1976, 57, 1051-1058

19.) ARTIS, W.M. JONES, H.E. et al. - Histamine inhibition of human lymphocyte transformation, Immunol., 1975, 1002

20.) WANG, S.R. ZWEIMANN, B. - Histamine suppression of human lymphocyte responses to mitogens, Cell.Immunol., 1978, 36, 28-36

21.) OGDEN, B.E. HILL, H.R. - Histamine regulates lymphocyte mitogenic responses through activation of specific H_1 and H_2 histamine receptors, Immunol., 1980, 41, 107-114

22.) PLAUT, M. LICHTENSTEIN. L.M. et al. - Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis, IV. Specificity of the histamine receptor on effector T-cells, J.Immunol., 1973, 111/2, 389-394

23.) PLAUT, M. BERMAN, J. - Histamine receptors on human and mouse lymphocytes, J.Allerg.Clin.Immunol., 1978, 61/3, 132-133

24.) ROBERTSON, A.J. PEDEN, N.R. et al. - Cimetidine and the immun response, Lancet, 1979, 25, 420-421

25.) FESTEN, H.P.M. de PAUW, B.E. et al. - Cimetidine does not influence immunological parameters in man, Clin.Immunol.Immunopath., 1981, 21, 33-38

26.) RAPTOPOULOU, M. AKRIVIADIS, E. et al. - Peripheral blood T-lymphocytes in patients with duodenal ulcers treated with cimetidine, Clin.exp.Immunol., 1982, 48, 186-188

27.) PEDEN, N.R. ROBERTSON, A.J. et al. - Mitogen stimulation of peripheral blood lymphocytes of duodenal ulcer patients during treatment with cimetidine or ranitidine, Gut, 1982, 23, 398-403

28.) ANDRÉ, F.
DRUQUET, M.
et al.
- Traitment pour la cimetidine et immunité humorale,
Gastroenterol.Clin.Biol., 1978, 2, 755-756

29.) McGREGOR, C.G.A.
OGG, L.J.
et al.
- Immunological and others laboratory studies of patients receiving short-term cimetidine therapy,
Lancet, 1977, 15, 122-123

30.) BADGER, A.M.
BROWN, A.E.
et al.
- The effect of cimetidine on antibody synthesis in vitro and in vivo,
Immunol., 1983, 48, 151-155

31.) ERSHLER, W.B.
HACKER, M.P.
et al.
- Cimetidine and the immune response, I. In vivo augmentation of nonspecific and specific immune response,
Clin.Immunol.Immunopath., 1983, 26, 10-17

32.) BROSTOFF, J.
PACK, S.
et al.
- Histamine suppression of lymphocyte activation,
Clin.Exp.Immunol., 1980, 39, 739-745

33.) CHARPENTIER, B.
LANG, P.
et al.
- Cimetidine does not stimulate in vitro human lymphocyte functions,
Eur.J.Clin.Invest., 1981, 11, 7 (abstract)

34.) SIMON, M.R.
SALBERG, D.J.
et al.
- In vivo cimetidine augmentation of phythaemagglutinin-induced human lymphocyte thymidin uptake,
Transplantation, 1981, 31/5, 400-401

35.) SMITH, M.D.
COUHIG, E. et al.
- Cimetidine and the immune response,
Lancet, 1979, 30, 1406-1407

36.) WOLFE, J.D.
PLAUT, M.
et al.
- The effect of an H_2-receptor antagonist on immediate and delayed skin test reactivity in man,
J.Allergy Clin.Immunol., 1979, 3, 208

37.) GUERRE, J.
BARS, L.
et al.
- Etude de l'immunité cellulaire chez les ulcereux traites par la cimetidine,
Gastroenterol.Clin.Biol., 1981, 5, 217a (abstract)

38.) RODER, J.C.
KLEIN, M.
- Target-effector interaction in the natural killer cell system, IV. Modulation by cyclic nucleotides, J.Immunol., 1979, 6, 2785-2790

39.) RUIZ-ARGUELLES, A.
SEROOGY, K.B.
et al.
- In vitro effect of cimetidine on human cell-mediated cytotoxicity, I. Inhibition of natural killer cell activity, Cell.Immunol., 1982, 69, 1-12

40.) LANG, I.
GERGELY, P.
et al.
- Effect of histamine-receptor blocking on human spontaneous lymphocyte-mediated cytotoxicity, Scand.J.Immunol., 1981, 14, 573-576

41.) PRIMACK, W.A.
- Cimetidine and renal-allograft rejection, Lancet, 1978, 15, 824-825

42.) RUDGE, C.J.
JONES, R.H.
et al.
- Cimetidine and renal-allograft rejection, Lancet, 1978, 27, 1154

43.) ZAMMIT, M.
TOLEDO-PEREYRA, L.H.
- Cimetidine for kidney transplantation: Experimental observations, Surgery, 1979, Okt., 611-619

44.) GIFFORD, R.R.M.
SCHMITTKE, J.R.
et al.
- Cimetidine modulation of lymphocytes from renal allograft recipients, Transplant.Proc., 1981, 13/1, 663-667

45.) BURLESON, R.L.
KRONHAUS, R.J.
et al.
- Cimetidine, posttransplant peptic ulcer complications and renal allograft survival, Arch.Surg., 1982, 117, 933-935

46.) OSBAND, M.E.
SHEN, Y.J.
et al.
- Successful tumor immunotherapy with cimetidine in mice, Lancet, 1981, 21, 636-638

47.) GIFFORD, R.R.M.
FERGUSON, R.M.
et al.
- Cimetidine reduction of tumour formation in mice, Lancet, 1981, 21, 638-639

48.) ARMITAGE, J.O.
SIDNER, R.D.
- Antitumour effect of cimetidine, Lancet, 1979, 21, 882-883

49.) BÖYUM, A. - Separation of lymphocytes from blood and bone marrow, Scand.J.Clin.Lab.Invest., 1968, 21 (Suppl. 97), 51-76

50.) GALILI, U. SCHLESINGER, M. - The formation of stable E-rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells, J.Immunol., 1974, 112/5, 1628-1634

51.) HERRMANN, F. WIRTHMÜLLER, R. - Cell-surface-marker phenotyping in patients with leukemic non-hodgkin lymphomas of low and intermediate malignancy, Immunobiol., 1982, 163, 77-94

52.) REINHERZ, E.L. KUNG, P.C. et al. - Discrete stages of intrathymic differentation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage, Proc.Nat.Acad.Sci. (USA), 1980, 77, 1588-1592

53.) BREARD, J. REINHERZ, E.L. et al. - A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes, J.Immunol., 1980, 124, 1943-1948

54.) ABO, T. COOPER, M.D. et al. - Characterization of HNK-1^+ (Leu 7) human lymphocytes: I. Two distinct phenotypes of human NK-cells with different cytotoxic capability, J.Immunol., 1982, 129/4, 1752-1757

55.) ABO, T. BALCH, C.M. - In vitro propagation of cultured human natural killer cells expressing the HNK-1 differentiation antigen and spontaneous cytotoxic function, Eur.J.Immunol., 1983, 13, 383-389

56.) ABO, T.
BALCH, C.M.
- "Probes for the study of autoimmunity and immunodeficiency" aus: Monoclonal antibodies, Haynes, B.F., Eisenbarth, G.S. (Hrsg.), Academic Press New York, 1983, 97-113

57.) HERRMANN, F.
SIEBER, G.
- Expanded T γ-cell populations with the morphology of large granular lymphocytes -
I. Immunological, clinical and morphological characterization,
Leukemia research, 1983, 7/5, 667-680

58.) LAMPSON, L.A.
LEVY, R.
- Two populations of la-like molecules on a human B-cell line,
J.Immunol., 1980, 125, 293-299

59.) ABRAHAMSON, C.S.
KERSEY, J.H.
et al.
- A monoclonal antibody (BA 1) reactive with cells of human B-lymphocyte lineage,
J.Immunol., 1981, 126, 83-88

60.) ABO, T.
BALCH, C.M.
- A differentiation antigen of human NK and K cells indentified by a monoclonal antibody (HNK-1),
J.Immunol., 1981, 127, 1024-1029

61.) ABO, T.
BALCH, C.M.
- Characterization of HNK-1^+ (Leu 7) human lymphocytes:
II. Distinguishing phenotypic and functional properties of natural killer cells from activated NK-like cells,
J.Immunol., 1982, 129, 1758-1761

62.) PROSS, H.F.
JONDAL, M.
- Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T-lymphocytes,
Clin.exp.Immunol., 1975, 21, 226-235

63.) WEST, W.H.
CANNON, G.B.
et al.
- Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: Characterization of effector cells,
J.Immunol., 1977, 118, 355-361

64.) OZER, H.
STRELKAUSKAS, A.J.
et al.
- The functional dissection of human peripheral null cells with respect of antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killing,
Eur.J.Immunol., 1979, 9, 112-118

65.) SIEBER, G.
BOCHERT, G.
- Characteristics of immunglobulin secretion in man evaluated by a reverse hemolytic plaque assay,
Blut, 1980, 41, 81-92

66.) SAMPLE, W.F.
CHRETIEN, P.B.
- Thymidine kinetics in human lymphocyte transformation: Determination of optimal labelling conditions,
Clin.Exp.Immunol., 1971, 9, 419

67.) SCHELLEKENS, P.
EIJSVOGEL, U.P.
- Lymphocyte transformation in vitro: I. Tissue culture conditions and quantitative measurement,
Clin.exp.Immunol., 1968, 3, 571

68.) OPPENHEIM, J.J.
ROSENSTREICH, D.L.
- Signals regulating in vitro activation of lymphocytes,
Prog.Allergy, 1976, 20, 65-194

69.) BODEMAR, G.
NORLANDER, G.
et al.
- Pharmacokinetics of cimetidine after single doses and during continuous treatment,
Clin.Pharmacokinetics, 1981, 6, 306-315

70.) WILCOXON, F.
- Individual comparisons by ranking methods,
Biometrics Bull., 1945, 1, 80-83

71.) SACHS, L.
- Angewandte Statistik,
Springer-Verlag, Berlin, 1974, 4. Aufl., 244-246

72.) DIEM, K.
LEUTNER, C.
- Documenta Geigy,
G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1975, 128, 193

73.) HERBERMAN, R.B.
- Natural killer cells and cells mediating antibody-dependend cytotoxicity against tumors,
Clin.Immunobiol., 1980, 4, 73-88

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Brücher und Herrn Professor Dr. H. Rühl für die Überlassung des Themas und dafür, daß ich in den Forschungslabors der hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz selbständig und unter sehr guten Bedingungen habe arbeiten können.

Allen medizinisch-technischen Assistentinnen in den Labors und ganz besonders Frau B. Komischke sei gedankt für die hervorragende Zusammenarbeit und die freundliche Aufnahme. Ich habe mich als Mitarbeiter der Abteilung fühlen können.

Herrn Dr. Rehs danke ich für die Vermittlung einiger Patienten, ebenso Herrn Dr. W.-D. Ludwig, dessen Zuspruch mir zudem in schwieriger Zeit Mut gemacht hat.

Vor allem danke ich Herrn Dr. F. Herrmann, der diese Arbeit in jeder Phase ihrer Entstehung betreut hat.

LEBENSLAUF

Am 11. März 1955 wurde ich, Arnd Schreckenberg, als Sohn von Margarethe Schreckenberg, geb. Schaardt, Leiterin einer Grundschule in Brake/Unterweser und Julius Schreckenberg, Landwirtschaftsdirektor i.R., in Nordenham geboren.

Seit 1959 wohnte ich in Brake/Unterweser, wo ich 1961 eingeschult wurde, 1964 auf das Gymnasium Brake wechselte und im Mai 1973 die Reifeprüfung bestand.

Von Oktober 1973 bis September 1974 war ich in der Inneren Abteilung des St. Bernhard-Hospitals in Brake in der Krankenpflege tätig.

Von Oktober 1974 bis Dezember 1975 leistete ich meinen Grundwehrdienst als Sanitäter und Krankenwagenfahrer.

Beim Lette-Verein in Berlin absolvierte ich vom April 1976 an eine Ausbildung zum medizinisch-technischen Laboratoriumsassistenten und bestand im März 1978 das Staatsexamen.

Seit April 1978 studierte ich Humanmedizin an der Freien Universität Berlin und bestand im Oktober 1984 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Während meiner Studienzeit war ich von April 1979 bis September 1983 als studentischer Tutor im Kurs für mikroskopische Anatomie im Institut für Anatomie der Freien Universität Berlin beschäftigt.

Seit Februar 1985 bin ich als wissenschaftlicher Assistent an der Universitätsklinik Kiel der Christian-Albrechts-Universität in der Abteilung für Anästhesiologie angestellt.

Ich bin seit Mai 1983 verheiratet mit Elisabeth Schreckenberg, geb. Faeth, medizinisch-technische Assistentin und Fachassistentin für Klinische Chemie, und wir haben ein Kind.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen